



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/62, C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/10, 1/21</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/04109</b>
			(43) Date de publication internationale: <b>6 février 1997 (06.02.97)</b>
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR96/01132</b>		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: <b>18 juillet 1996 (18.07.96)</b>		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: <b>95/08901V 21 juillet 1995 (21.07.95)</b>		FR	
(71) Déposants ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; Etablissement Public, 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR). UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNES [FR/FR]; Etablissement Public, Villa Douce, 9, boulevard de la Paix, F-51097 Reims (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): KLATZMANN, David [FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris (FR). COHEN, Jacques [FR/FR]; 17, rue de Sillery, F-51100 Reims (FR).			
(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title:  **$\alpha$ - $\beta$  C4BP-TYPE RECOMBINANT HETEROMULTIMERIC PROTEINS**(54) Titre: **PROTEINES HETERO-MULTIMERIQUES RECOMBINANTES DU TYPE  $\alpha$  -  $\beta$  C4BP**

## (57) Abstract

A recombinant heteromultimeric protein including at least (a) a polypeptide fusion molecule A consisting of a C4BP  $\alpha$ -chain C-terminal fragment between amino acids 124 and 549, and a polypeptide fragment heterologous to said  $\alpha$ -chain, and (b) a polypeptide fusion molecule B consisting of a C4BP  $\beta$ -chain C-terminal fragment between amino acids 120 and 235, and a polypeptide fragment heterologous to said  $\beta$ -chain, wherein molecules (a) and (b) are linked in the C-terminal portion thereof to form said multimeric protein.

## (57) Abrégé

Protéine multimérique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins: a) une molécule de fusion A, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP compris entre les acides aminés 124 et 549 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à ladite chaîne  $\alpha$ , b) une molécule de fusion B, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  de la C4BP compris entre les acides aminés 120 et 235 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à la chaîne  $\beta$ , les molécules en a) et b) étant associées dans leur partie C-terminale pour former ladite protéine multimérique.

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GR	Grecce			VN	Viet Nam

**PROTEINES HETERO-MULTIMERIQUES RECOMBINANTES**  
**DU TYPE  $\alpha$  -  $\beta$  C4BP**

5 La présente invention porte sur des protéines de fusion hétéro-multimériques de type C4BP, les compositions les contenant ainsi que leur procédé de préparation. Plus particulièrement, cette invention est relative à des protéines de fusion hétéro-multimériques issues de l'association de monomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine C4BP ou de fragments de ceux-ci, ces monomères étant fusionnés à des polypeptides issus de protéines à activité fonctionnelle ayant des propriétés de ligand ou de récepteur.

10 Les numéros entre parenthèse sont relatifs à la liste bibliographique en fin de texte.

La « C4BP- binding protein » (C4BP) appelée auparavant protéine riche en proline, est une protéine importante à la fois dans le système de la coagulation (1), et dans le système du complément (2, 3). La forme majoritaire de la C4BP est composée de 7 chaînes  $\alpha$  identiques de 75 Kd et d'une chaîne  $\beta$  de 45 Kd. La séquence de nucléotide du cDNA et la séquence protéique de la chaîne  $\alpha$  ont été déterminées (4). Une

15 description complète de la C4BP humaine, son isolement et sa caractérisation ont été décrits dans (2) ; une mise à jour des connaissances sur cette molécule a été synthétisée dans (5).

20 L'existence des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  était inconnue jusqu'en 1990, ce n'est qu'en 1990 que A. Hillarp a mis en évidence pour la première fois l'existence dans la protéine multimérique une nouvelle sous-unité désignée chaîne  $\beta$ , et qui contient le site de liaison à la protéine S (6, 7).

25 La demande de brevet BIOGEN WO 91/1146 décrit des protéines multimériques du type C4BP uniquement constituées de monomères  $\alpha$  dans lesquels la partie N-terminale a été substituée par un fragment de la protéine CD4.

30

Cependant, les constructions décrites dans ce document ne mettent en oeuvre que la chaîne  $\alpha$ , la chaîne  $\beta$  étant inconnue à cette époque. L'inconvénient de ces constructions est qu'il est extrêmement difficile de contrôler l'état physique de la molécule synthétique c'est-à-dire le nombre de monomères qui s'associent d'une part, et d'autre part lorsque l'on souhaite associer au sein du multimère deux parties fonctionnelles différentes, de contrôler les proportions de ces éléments fonctionnels.

Des agents thérapeutiques ayant une fonction au niveau du système immunitaire, qu'il soit cellulaire ou humoral, ou agent d'immuno-intervention, se sont développés dans de nombreuses directions ; les champs d'application des immuno-interventions thérapeutiques des anticorps surtout des anticorps monoclonaux restent cependant aujourd'hui modestes, du fait de la mauvaise maîtrise des phénomènes survenants après leur liaison cellulaire. En effet, même humanisés, on ne sait aujourd'hui utiliser ces anticorps qu'à des fins de destruction cellulaire.

Le développement d'anticorps bi-spécifiques a également été envisagé et certains d'entre eux comportent une partie susceptible de se lier à un antigène et l'autre partie ayant une qualité de ligand vis-à-vis d'un récepteur permettant d'effectuer le routage vers un système cellulaire (8). Cependant, ces systèmes ne permettent pas d'associer plusieurs ligands dans un même complexe, ce qui dans certains cas semble nécessaire au déclenchement d'une réponse immunitaire.

Un autre système multimérisant proposé repose sur le Fc de l'IgM ; il possède plusieurs inconvénients : le principal est de réaliser des espèces moléculaires de tailles variables laissant des résidus sulfhydryles libres capables de réagir avec des molécules plasmatiques ou des surfaces cellulaires. En outre, les fonctions du fragment Fc de liaison au récepteur cellulaire et d'activation du complément peuvent être indésirables.

Un molécule hétéro-multimérique recombinante peut permettre au contraire d'associer plusieurs fonctions anticorps, ou plusieurs molécules

d'enzymes ou plusieurs antigènes ou des fragments ou des mélanges de ceux-ci, réalisant un traceur multi-valent ayant un meilleur potentiel d'amplification du signal détecté en comparaison d'une protéine de fusion associant un seul anticorps ou un anticorps bi-spécifique et une molécule enzymatique ou antigénique.

Cette approche peut permettre d'envisager, outre l'opsonisation par déclenchement de l'immunité cellulaire, la mise en oeuvre provoquée de l'immunité humorale par l'activation du complément.

L'objectif de la présente invention est donc de développer des molécules chimériques recombinantes solubles hétéro-multimériques associant des fonctions différentes dans une même molécule, dans une perspective d'immuno-intervention en pathologie dysimmunitaire humaine. Ces molécules permettront d'intervenir dans les mécanismes physiopathologiques des différentes affections, notamment dans les domaines relatifs :

- à la pathologie du transport et de l'élimination des complexes immuns par les érythrocytes, avec une application notamment au Lupus erythémateux disséminé, ou aux infections VIH,
- à la capture des antigènes médiee par les récepteurs Fc en surface des cellules de la lignée monocyte-macrophage,
- à la modulation par des molécules à activité CD16 soluble,
- à la prévention de l'allo-immunisation anti Rh(D) érythrocytaire,
- à l'inhibition de la pénétration cellulaire du virus VIH à l'aide de formes solubles de CD4, d'anticorps dirigés contre les constituants du virus, et/ou de molécules à fonctions enzymatiques.

La présente invention porte sur une protéine multimérique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

a) une molécule de fusion, de nature polypeptidique A constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP compris entre les

acides aminés 549 et 124, et d'un fragment polypeptidique hétérologue à ladite chaîne  $\alpha$ ,

b) une molécule de fusion B, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  de la C4BP compris entre les 5 acides aminés 235 et 120, et d'un fragment polypeptidique hétérologue à la chaîne  $\beta$ ,

Les acides aminés 549 ou 235 représentant respectivement les extrémités C-terminales des molécules de fusion, les fragments hétérologues étant fusionnés par leur extrémité N-terminale au résidu des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  10 respectivement, les molécules en a) et b) étant associées entre elles par leur partie C terminale pour former ladite protéine multimérique.

Préférentiellement, une protéine multimérique recombinante selon l'invention est caractérisée en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  est compris entre les acides aminés 549 et 493 et, en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  est compris entre les acides aminés 235 et 176.

La réassociation des molécules de fusion est réalisée par la formation de points disulfures entre les cystéines en position 498 et 510 de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$ , et les cystéines en position 199 et 185 de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\beta$ .

20 Toute chimère entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  associant le cas échéant une cystéine de la chaîne  $\alpha$  et une cystéine de la chaîne  $\beta$  dans la molécule de fusion A, ou B, ou dans les deux, entre également dans la portée des constructions des protéines multimériques de l'invention.

Notamment, la possibilité de modifier l'espacement entre les deux 25 cystéines peut permettre de modifier le nombre de monomères entrant dans la constitution du multimère.

A titre d'illustration, une augmentation de la distance entre les cystéines peut conduire à une augmentation du nombre de monomères entrant dans le multimère ; en revanche, une diminution de cette distance entraînerait 30 une diminution de ce nombre. Dans certains cas, il peut être avantageux

de modifier cette distance de telle façon à modifier la réassocation contrôlée des deux types de chaînes porteuses d'un ligand ou d'un récepteur, quant à leur nombre et à leur proportion.

Dans la présente invention, il a été mis au point un système multimérisant

5 permettant d'obtenir des formules hepta et octamériques à l'aide de l'extrémité C-terminale des chaînes élémentaires de la molécule C4BP. La multimérisation de molécules dont l'extrémité C terminale a été remplacée par la partie C-terminale de la C4BP  $\alpha$  ou de la C4BP  $\beta$ , fournit une forme octamérique.

10 En tout état de cause, le fragment issu de la chaîne  $\beta$  de la C4BP doit être dépourvu des sites de fixation à la protéine S, lesquels sites se situent au niveau des deux SCR de la partie proximale de l'extrémité N-terminale de la chaîne  $\beta$ .

Ainsi, une protéine multimérique recombinante selon l'invention est  
15 caractérisée en ce que le rapport en nombre de monomères  $\alpha$  /  $\beta$  varie entre 7/1 et 5/3, et est de préférence de 7/1 quand les fragments des parties C-terminales ont une provenance homogène dans les fragments A et B ci-dessus.

Idéalement, la molécule recombinante multimérisante est une protéine  
20 n'associant que des constituants humains, évitant ainsi toute immunisation xénogénique, et n'activant pas le complément sauf fonctions spécifiques ajoutées intentionnellement dans ce sens. Une telle molécule ne doit pas interagir avec des récepteurs cellulaires ou des molécules plasmatiques et assurer ainsi une meilleure activité à la molécule chimérique par sa multivalence, ainsi qu'une plus longue durée de vie.

Une protéine multimérique selon la présente invention présente des propriétés relatives à l'immuno-intervention, notamment une capacité à moduler l'activité du complément aux fins de générer une opsonisation de manière artificielle. C'est par le caractère hétérofonctionnel que l'on peut

attribuer à cette protéine, grâce à l'apport de fragments N-terminaux hétérologues, que ce résultat est obtenu.

A ces fins, une protéine recombinante conforme à l'invention est caractérisée en ce que les fragments hétérologues en A et en B sont issus de ligands spécifiques du système immunitaire, notamment de protéines lymphocytaires de surface du type CD, des anticorps ou de fragments d'anticorps, des antigènes ou de fragments d'antigènes ; les fragments hétérologues en A et B peuvent, selon l'application que l'on souhaite donner à la protéine recombinante, être choisis, sans caractère exhaustif, 10 parmi les polypeptides à activité de ligands suivants :

- i) - des fragments issus de protéines lymphocytaires sont le CD4, le CD8, le CD16, le CD35 (ou CR1),
- ii) - des anticorps ou fragments d'anticorps ont une spécificité anti-erythrocytaire et notamment anti Rh(D),
- 15 iii) - des antigènes, notamment des antigènes vaccinants, comme le pré-S2 du virus de l'hépatite B,
- iv) - une enzyme à visée thérapeutique ou plus particulièrement le fragment de cette enzyme correspondant au site actif dudit enzyme, qui peut être fusionné avec la partie C-terminale de la chaîne alpha pour former le fragment A, le fragment B pouvant alors être constitué 20 par tout type de polypeptide tel que cité en i) à iii).

Encore plus particulièrement, des combinaisons de A et B particulièrement avantageuses pour mettre en oeuvre l'immuno-intervention de l'invention peuvent être des protéines multimériques dans lesquelles les fragments 25 polypeptidiques de fusion contiennent :

- v) - en A le CD4 ou, un dérivé du CD4 et,
- en B le sc Fv d'un anti Rh(D) ou d'autres anticorps notamment des anticorps neutralisants, ou des cibles antigéniques.

Une autre construction avantageuse est une protéine multimérique dans 30 laquelle les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

- en A un antigène, notamment un antigène vaccinant ou une enzyme thérapeutique ou un CD35 (ou CR1) ou un anticorps, ou tout fragment de ceux-ci possédant la propriété de ligand de la molécule entière ;
- 5 - en B un anticorps ou un fragment de celui-ci ayant conservé son épitope ;

Une autre protéine multimérique recombinante avantageuse sont celles dans lesquelles les fragments polypeptidiques de fusion contient :

- en A un immogène vaccinant et
- 10 - en B un CD4 ou une molécule dérivée pourvu qu'elle conserve la propriété du ligand de la molécule entière.

En outre, la présente invention vise les cellules eucaryotes ou procaryotes transduites par un ou plusieurs plasmides contenant une séquence d'acide nucléique hétérologue et codant au moins pour une molécule 15 polypeptidique de fusion A et une molécule polypeptidique de fusion B.

Les différentes lignées cellulaires qui peuvent être utilisées pour être transduites par des plasmides sont de préférence des cellules eucaryotes susceptibles de réaliser la glycosylation post-traductionnelle ; on peut citer à titre d'exemple, des levures ou des cellules de lignées animales telles 20 des cellules de types fibroblastiques, comme les BHK ou les CHO, ou encore des lignées lymphocytaires comme des lymphocytes immortalisés.

Selon différentes réalisations de la présente invention, les cellules peuvent être :

- co-transduites par deux plasmides distincts, ou
- 25 - transduites par un plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide ou,
- résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par le plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par 30 un plasmide codant pour le deuxième poplypeptide.

Les fusions de cellules sont réalisées par des méthodes classiques, soit par action du PEG (polyéthylène glycol), ou encore par action du virus Epstein-Barr, ou toute autre méthode classique pour fusionner deux cellules eucaryotes différentes.

5 Plus particulièrement, lesdites cellules peuvent être transduites par le premier plasmide qui est celui déposé le 12 juillet 1995 à la C.N.C.M. sous le N° I-1610 et par le deuxième plasmide qui est celui déposé à la C.N.C.M; le 12 juillet 1995 sous le N° I-1611.

La présente invention concerne également un procédé de préparation  
10 d'une protéine multimérique selon l'invention. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- la transduction de lignées cellulaires cibles par au moins un plasmide contenant une séquence hétérologue codant pour une chaîne A ou B, telles que définies ci-dessus,
- 15 - l'expression et l'isolement des chaînes hétérologues A ou B,
- la mise en milieu oxydant desdits polypeptides, dans des proportions déterminées,
- l'isolement des multimères.

De préférence, ce procédé de préparation est caractérisé en ce que les  
20 lignées transduites ont été soit :

- co-transduites par deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou
- transduites par un plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide, ou ,
- résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par le plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par un plasmide codant pour le deuxième polypeptide.

Par ailleurs, la présente invention porte sur l'utilisation d'une protéine recombinante telle que précédemment définie, dans la fabrication d'un médicament, et plus particulièrement, d'un médicament destiné à :

- la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle ou,
- la thérapeutique, ou la prophylaxie des infections virales, bactériennes ou parasitaires,
- la thérapeutique des maladies auto-immunes et notamment le lupus erythémateux disséminé, ou les maladies allo-immunes.

5 De façon plus générale, la présente invention porte sur l'utilisation d'une protéine recombinante telle que précédemment définie dans la fabrication d'un médicament permettant, selon la fonctionnalité attribuée aux ligands, ou aux récepteurs, une immuno-intervention notamment dans  
10 l'opsonisation ou la non-opsonisation de cellules cibles, par activation, modulation ou inhibition du complément.

L'homme du métier saura, au fur et à mesure de la découverte des fonctionnalités de certaines protéines ou de certains ligands ou récepteurs, construire une protéine multimérique recombinante selon l'invention la  
15 mieux adaptée à l'effet recherché.

Avantageusement, l'utilisation de la protéine multimérique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle permet une activation du complément suffisante à provoquer l'opsonisation de cellules dont les sites antigéniques ou épitopiques ne sont pas naturellement susceptibles de  
20 déclencher une telle activation.

Entre également dans le cadre de la présente invention une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend en tant que principe actif une protéine multimérique recombinante telle que décrite ci-dessus. Ladite composition pharmaceutique peut permettre une immuno-thérapie  
25 ou une immuno-prévention de différentes pathologies notamment celles liées aux infections virales, bactériennes, aux maladies auto-immunes ou allo-immunes.

Une protéine recombinante selon l'invention est également utilisable dans un test de diagnostic nécessitant l'intervention d'au moins deux ligands ou  
30 récepteurs différents.

La faisabilité du multimère de très haut poids moléculaire a été vérifiée dans un modèle de multi CR1 (env. 1,5 million daltons). Cette molécule est fonctionnelle et inhibe l'activation du complément dans un modèle de lyse dépendante du complément, d'erythrocytes recouverts d'anticorps, à des 5 concentrations inférieures à celles requises pour le CR1 soluble monomérique.

La faisabilité d'hétéro-chimères associant différentes fonctions a été établie ensuite en utilisant, d'une part l'anticorps anti Rh(D), et plus particulièrement la partie variable Fv de cet anticorps et plus 10 particulièrement encore la partie simple chaîne de cette partie variable appelée scFv, dans le cas présent associée à la molécule CD35 ou (CR1) susceptible d'inhiber ou de moduler l'activité du complément ; l'autre système utilisé est un système hétéro-multimérique de type CD4/antigène.

Les exemples qui suivent, n'ont aucun caractère limitatif et ne servent qu'à 15 démontrer la faisabilité des constructions de ces hétéro-multimères recombinants à des fins d'immuno-intervention ; les figures qui illustrent les exemples ont les significations suivantes :

- la figure 1 représente un vecteur d'expression constitué d'un plasmide contenant la séquence codant pour le CD4 et appelée sT4CD4-C4 BP ;
- 20 - la figure 2 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le CD16 multimérique .
- la figure 3 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le CR1 multimérique ;
- 25 - la figure 4 représente un autre vecteur plasmidique, pCDM8, codant pour le même CR1 multimérique ;
- la figure 5 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) multimérique ;
- la figure 6 représente un autre vecteur plasmidique, pST4, contenant la même séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) ;
- 30 - la figure 7 représente un troisième vecteur plasmidique contenant cette même séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) ;

- la figure 8 représente un vecteur plasmidique de type pKC3B contenant la séquence codant pour le CR1-multimérique.

Dans toutes ces figures, les enzymes de restriction permettant l'insertion de la séquence hétérologue sont indiqués par leur nomenclature

5 classique.

- la figure 9 représente le résultat obtenu avec le scFv multimérique sur l'agglutination des globules rouges présentant ou ne présentant pas l'antigène Rhésus. Le tube en A représente le témoin positif dans lequel les globules rouges O Rh+ sont agglutinées par un anticorps monoclonal anti R(h) natif ; le tube B représente le témoin négatif dans lequel des globules rouges O Rh- ne sont pas agglutinées par le scFv anti R(h) des multimériques ; le tube C représente l'essai dans lequel des globules rouges O Rh+ et scFv anti Rh+ sont agglutinées ; le tube D est un autre témoin négatif dans lequel des globules rouges O Rh- sont mis en présence d'un milieu de culture sans anticorps.

10 - la figure 10 représente le profil obtenu en cytométrie de flux après fixation erythrocytaire d'une hétéro-chimère anti Rh(D) -CR1.

Cinq pistes sont représentées dans lesquelles :

- la première piste représente des globules rouges O Rh+ non papaïnés 20 avec une densité de CR1 de 180 sites ;

- la deuxième piste représente des globules rouges O Rh+ non papaïnés avec une densité de CR1 de 550 sites ;

- la troisième piste représente des globules rouges O Rh+ papaïnés, qui ont perdu leur densité de 180 sites de CR1 ; ces erythrocytes reconstitués 25 en CR1 à l'aide de l'hétéro-chimère scFv anti Rh+/CR1 expriment la densité supra physiologique de 1 200 sites CR1 par erythrocyte ;

- les pistes 4 et 5 représentent des témoins dans lesquels pour la piste 4, 30 sont des globules rouges O Rh+ papaïnés, et pour la piste 5, sont des globules rouges O Rh- papaïnés traités avec l'hétéro-chimère scFv anti Rh(D)/CR1.

### I - Construction des chaînes CR1 - C4 BP

L'avantage d'utiliser le CR1 dans une construction multimérique selon l'invention résulte des travaux des inventeurs sur le devenir physiologique du CR1 chez le sujet normal. Ils ont pu ainsi déterminer les paramètres 5 d'un catabolisme physiologique du CR1 érythrocytaire et ses relations avec le polymorphisme génétique de densité de CR1 érythrocytaire. Ils ont pu également préciser le catabolisme du CR1 érythrocytaire chez les patients lupiques, c'est-à-dire souffrant d'un lupus erythémateux disséminé. La distribution parmi les patients lupiques et les sujets 10 normaux des différents génotypes du polymorphisme de longueur et de nombre de sites de liaison C3b/C4b de CR1 a également été étudiée. Des molécules de CR1 recombinantes permettant de modifier la densité de CR1 érythrocytaire pour restaurer leur état physiologique ou réaliser des érythrocytes "armés" de densités "supra-physiologiques" de CR1 ont 15 ensuite été préparées. Le potentiel du CR1 soluble a été démontré dans différents modèles en particulier d'ischémie myocardique expérimentale et de phénomène d'Arthus. Une molécule de CR1 soluble multimérique est produite, et son pouvoir anti-inflammatoire, sa durée de vie plasmatique ainsi que son espace de distribution sont étudiés chez l'animal. Un 20 couplage chimique aux érythrocytes de monomères réduits par leur groupement SH libre est réalisée. Des érythrocytes sont ainsi armés de densités supraphysiologiques de CR1 présentés de façon fonctionnelle, et leur capacité de liaison de complexes immuns artificiels antigène Hbs/anticorps antiHbs opsonisés par du C3b est alors étudiée .

25 Les résultats obtenus avec un anti Rh(D) sont montrés dans l'exemple I ci-après.

Les constructions utilisées pour réaliser la transduction C4 BP - CR1 sont représentées dans les figures 3,4 et 8 dans les plasmides pMAMneo, pCDM8 et pKC3b.

a) Construction de pMAMneo CR1-C4BP :

L'ADN complémentaire codant pour le CR1 avait été inséré aux sites *Xho I* et *Not I* dans le plasmide pCDM8 (dû à l'obligeance de T. J. Bartow, D. T. Fearon et W. Wong, John Hopkins Hospital, Baltimore, U.S.A.).

5 La séquence codant pour la partie extra-membranaire du CR1 est extraite par digestion de ce plasmide par les enzymes de restriction *Xho I* et *Bal I*. La partie C terminale de la C4BP est amplifiée par les amorces 5'-GAGACCCCCGAAGGCTGTGA-3', et 5'-CTCGAGTTATAGTTCTTATCCCAAGTGG-3',

10 cette deuxième amorce contenant un codon stop et un site de restriction *Xho I*.

Les séquences codant pour la partie C terminale de la C4BP et pour la partie extra-membranaire du CR1 sont insérés dans pMAMNea (Clontech, Palo Alto, USA) au site *Xho I* (figure 3) CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pCDM8 (Invitrogen, San Diego, USA).

15 b) Construction pCDM8 CR1-C4BP :

La séquence codant pour la protéine de fusion CR1-C4BP a été extraite de pMAMNeo CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pCDM8 (Invitrogen, San Diego, USA) (figure 4).

20 c) Construction pKC3b CR1-C4BP :

La séquence codant pour la protéine de fusion CR1-C4BP a été extraite de pMAMNeo CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pKC3b (figure 8).

25 II - Construction du multimère recombinant :

Un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP a été recopié par PCR à partir de DNA génomique. Il figure dans un seul exon. La taille minimale se situe au-delà de la deuxième cystéine en partant de l'extrémité C-terminale, la taille optimale se situe quelques acides aminés au-delà, réalisant un espaceur de 5 à 10 acides aminés, soit au total 58 AA.

La taille maximale choisie est de 6 SCR pour éviter le site de liaison C3b-C4b. Ce fragment maximal est synthétisé à partir d'un cDNA du mRNA de la C4 BP, puisqu'il comporte plusieurs exons. Le fragment optimal de la partie C-terminale de la C4 BP est recopié à nouveau par PCR à l'aide 5 d'amorces pourvues à leurs extrémités de bras comportant les sites de restriction enzymatique adéquats pour un montage dans un vecteur donné comportant déjà le gène de la protéine que l'on souhaite multimériser. Un site enzymatique proche de la partie C-terminale de cette protéine, ou situé dans sa partie extra-membranaire, est choisi permettant l'insertion en 10 3' du fragment multimérisant.

L'extrémité 3' du fragment multimérisant est liée soit à un site du vecteur, soit à un site situé au-delà dans le gène de la protéine d'intérêt. La partie du gène de la protéine d'intérêt située en 3' du fragment multimérisant n'est de toute façon plus traduite, puisque le fragment multimérisant 15 comporte un codon stop.

Il est donc possible ainsi de modifier très facilement un vecteur d'expression contenant le gène d'une protéine donnée par la simple insertion du fragment, sans autre modification.

Les vecteurs pCDM8, ST4, pMAMneo, ont été utilisés pour les différents 20 exemples d'application du système multimérique selon l'invention.

L'homme du métier saura toujours trouver les vecteurs existants aujourd'hui ou qui risquent d'être mis au point, susceptibles de présenter la meilleure efficacité pour transduire la protéine de fusion dans les cellules est une affaire exprimée.

25

#### **Exemple d'application N° 1 :**

##### Prévention de l'alloimmunisation antiRh(D).

Dans le cadre d'une prévention de l'alloimmunisation anti Rh(D), des molécules hétéro-multimériques associant des fonctions érythrocytaires et 30 CR1 sont produites. Elles permettront une liaison aisée de CR1 à des érythrocytes assurant des densités de CR1 parfaitement maîtrisables.

La molécule d'anticorps utilisée pour produire le scFv anti Rh(D) a été produite et séquencée dans le laboratoire de Philippe ROUGER à l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS) (9).

Construction des vecteurs comportant la séquence codant pour le scFv

5 anti Rh(D) et la partie terminale de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP.

Dans un premier temps, un site épitopique d'un anticorps anti-Rhésus a été réduit en une structure de type scFv (pour single chaîne Fv) pour une expression dans E.Coli par transfection par un vecteur phagique.

Les constructions de type scFv sont des fragments d'anticorps

10 représentant la partie variable de l'anticorps et ne contenant qu'une seule chaîne. Cette technique a été décrite par G. WINTER (10). La séquence codante pour ce scFv a ensuite été transférée dans un vecteur d'expression après addition du système multimérisant.

Nous avons décrit plus haut la construction des vecteurs d'expressions

15 porteurs de la séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D), et qui sont représentés sur les figures 6 et 7.

La partie C terminale de la C4BP a été amplifiée par les amorce 5'-  
GC GGCCGCAGAGACCCCCGAAGGCTGTG-3' contenant un site de  
restriction *Not I* et 5'-CCACTTGGATAAAGAACTATAA-3' contenant un  
site de restriction *Xho I*.

Ce fragment a été inséré au site *Not I* en 3' du gène scFv anti Rh(D). Cette séquence a ensuite été insérée dans le plasmide pCDM8 et insérée aux sites *Hind III* et *Xho I* de pKC3b. Cette construction est représentée dans la figure 7.

25 La figure 5 représente une autre construction du scFv du anti Rh(D) C4BP dans le plasmide pKC 3B.

Les plasmides sont ensuite utilisés pour transduire des cellules animales et notamment des cellules CHO DHFR<sup>-</sup>.

30 Les cellules CHO-DHFR<sup>-</sup> (American Type Culture Collection, Rockville, USA) ont été transfectées selon la technique au phosphate de calcium (Calcium phosphate transfection kit, 5 prime 3 prime Inc., Boulder, U.S.A).

Les cellules sont cultivées en milieu HAM déficient en Hypoxanthine et Thymidine (Biochrom, Vindelle, France) avec 10 % de sérum de veau dialysé (SVF GIBCO BRL, Paisley, Ecosse) et 1% de glutamine (Sigma, St Louis, USA).

5 La fonctionnalité des protéines multimériques reconstituées, soit C4 BP-scFv, soit C4 BP-Rh(D)/CR1 a été étudiée.

La production fonctionnelle de scFv multimérique a été réalisée, telle que démontrée (i) par un marquage biosynthétique et une immunoprecipitation suivis d'analyse en PAGE SDS, (ii) par la détection en cytométrie de flux

10 de multi scFv anti Rh(D) fixés sur des érythrocytes, (iii) par le caractère agglutinant en faible force ionique sur des globules papaïnés de chimères multi scFv anti Rh(D), (iv) par analyse d'interactions moléculaires au moyen d'un appareil de détection d'ondes évanescentes (IASys FISONS) vérifiant la fixation sur des érythrocytes de la chimère multimérique anti

15 scFv anti Rh(D).

Par la suite, la faisabilité d'hétéromultimères associant différentes fonctions a été établie par la réalisation d'une chimère anti R(h)ésus D/CR1. Son caractère fonctionnel a été démontré en cytométrie de flux.

Les résultats obtenus en cytométrie de flux sont représentés sur la figure

20 10. Il est clair sur cette figure que si l'on compare les pistes 3 et 5 dans lesquelles respectivement les globules rouges sont Rh+ ou Rh-, on observe que seules les globules rouges possédant l'antigène de surface sont agglutinées. Ce que cette figure permet également de voir, c'est que ce n'est pas l'effet de la papaïne qui permet cette agglutination puisque les

25 globules rouges Rh+ papaïnées ne sont pas agglutinées par le CR1.

Il a été en effet possible de fixer une densité supraphysiologique de molécules CR1 sur des érythrocytes préalablement papaïnés et donc déplétés en CR1, par la fixation sur les molécules rhésus D d'une chimère mixte multimérique anti Rh(D) /CR1.

**Exemple d'application N° 2 : Destruction extracellulaire du VIH**

Si la réponse immune humorale est impuissante à éradiquer le virus VIH, elle est cependant efficace contre de nombreux agents infectieux contre lesquels des anticorps neutralisant sont régulièrement produits par les sujets vaccinés.

Des anticorps naturels peuvent conférer une protection contre de nombreux agents infectieux bactériens ou viraux, infectant d'autres espèces.

Certains motifs antigéniques ont été caractérisés comme cibles de ce type 10 d'anticorps pour leur rôle dans le rejet suraigu vasculaire de transplantation xénogéniques.

Le rôle potentiellement défavorable de la réponse immune humorale et de l'activation du complément vis-à-vis de l'infection par virus VIH a été démontré.

15 Dans certaines circonstances, l'opsonisation des virions peut conduire à faciliter l'ingestion macrophagique ou la liaison lymphocytaire des virions par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires pour le complément ou le fragment Fc des IgG. En revanche le virus VIH, en tant que virus enveloppé, est extrêmement sensible à l'action lytique du complément lorsque l'activation de ce dernier est suffisante pour initier sa voie finale 20 lytique ainsi que la fixation de son complexe d'attaque membranaire. Les rétrovirus xénogènes sont détruits extrêmement efficacement par le sérum humain normal du fait de l'existence d'anticorps naturels, par l'intermédiaire d'une activation du complément. Ce phénomène avait même 25 fait conclure dans les années 1970 à l'immunité naturelle de l'espèce humaine vis-à-vis des rétrovirus.

Le but recherché est le détournement d'une réponse immune humorale lytique vers les virions VIH, l'attachement aux virions étant réalisé par la composante CD4 d'une protéine recombinante hétéromultimérique. Pour cela, les inventeurs ont pris en compte le fait que la très grande variabilité

du virus VIH est cependant limitée par le maintien constant, essentiel pour le virus, d'une capacité de liaison à CD4, pour sa pénétration cellulaire.

Réiproquement, la molécule CD4 est capable de se lier à l'ensemble des virions VIH, au contraire de nombreux anticorps neutralisants au spectre

5 d'efficacité restreint à un petit nombre de sous-type. La molécule de CD4 soluble inhibe l'infection cellulaire par le VIH. Cependant, les concentrations nécessaires à son action, particulièrement pour la neutralisation d'isolats sauvages, rendent impraticable son emploi clinique.  
10 Différentes tentatives ont été faites pour améliorer sa demi-vie, son avidité et/ou apporter une fonction Fc gamma effectrice de liaison cellulaire ou d'activation de complément par des constructions de type : CD4/IgG bi ou tétravalent.

Les inventeurs ont développé une molécule CD4 multivalente heptamérique à l'aide d'un système multimérisant C4BP, dont l'efficacité 15 biologique in vitro a été démontrée par l'inhibition de l'infection de cellules sensibles par le VIH à des concentrations inhibitrices usuelles de CD4 soluble monomérique.

Dans le présent exemple, les inventeurs ont, plutôt que d'inhiber la 20 pénétration cellulaire du virus, cherché à obtenir sa destruction extracellulaire à l'aide de molécules solubles capables, d'une part de se lier sur le virion, et d'autre part d'apporter une fonction effectrice antigène,

élicitant la destruction du virus par une réponse anticorps dépendante du 25 complément préexistante chez l'individu. Cette réponse est dirigée contre un antigène sans rapport avec le VIH, mais vis-à-vis duquel une efficacité neutralisante et lytique du système immunitaire a été néanmoins testée.

En d'autres termes, le virus VIH ayant la capacité de se « déguiser », de se « cacher » ou d'« agiter des leurres », les inventeurs ont cherché à l'orner de cibles que le système immunitaire de l'individu sait identifier et traiter efficacement.

Pour ce faire, deux constructions plasmidiques ont été réalisées portant respectivement le CD4 ou le fragment du CD4 porteur de la fraction «ligand » et un antigène.

5    a) Construction du vecteur ST4 CD4-C4BP

Les 183 derniers acides nucléiques de la séquence codant pour la C4BP ont été amplifiés par PCR sur de l'ADN génomique, en utilisant les amores : 5'-GAGACCCCGAAGGCTGTGTGA-3' et 5'ATTTCTAGAGAGTTAGTTCTTATCCAAAGTCCA-3', cette dernière amorce contenant un codon stop et un site de restriction pour Xba I. Ce fragment de PCR a été lié en 5' à une séquence oligonucléotidique synthétique double-brins:

5'CCGGGACAGGTCCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACAG-3'. Ce fragment codant pour l'extrémité C-terminale de la partie extramembranaire de CD4 et ayant un site Ava I en 5'.

Cette séquence a été insérée aux sites Ava I et Xba I dans le plasmide sT4 CD4 contenant la construction codant pour le CD4 soluble et cette construction est représentée sur la figure 1.

20    b) Construction des molécules de fusion C4BP- antigènes

Dans un premier temps il s'agit de rechercher quels paramètres conduisent la réponse anticorps gp 120 des sujets infectés à une activation du complément jusqu'à la boucle d'amplification du C3, aboutissant à une opsonisation plutôt favorable à l'individu, sans s'accompagner pour autant de l'activation de la voie finale commune qui aboutirait à la lyse du virion.

Le rôle de molécules de surface d'inhibition de l'activation du complément que le virion a emporté de la surface cellulaire, est démontré. Le relargage de particules d'enveloppe lors de la fixation d'anticorps (shedding) est également défavorable à l'activation terminale du complément. L'activation de la voie finale commune du complément nécessite une densité critique d'activation du C3 pour initier la conversion de C5. Celle-ci n'est pas

réalisée par la fixation d'IgG sur des épitopes de la gp 120 trop éloignés les uns des autres.

L'apport d'une « grappe » d'antigènes grâce aux constructions de l'invention pour chaque site de liaison sur le virion permet donc de 5 déclencher une activation locale suffisante du complément.

Différentes catégories d'antigènes ont été considérées : des antigènes vaccinaux, des antigènes bactériens contre lesquels l'espèce humaine est universellement immunisée, des antigènes xénogéniques cibles d'anticorps naturels.

10 - des antigènes vaccinaux existant sous forme de gènes clonés codant pour une protéine exprimable en cellules eucaryotes (antigène Hbs, anatoxine tétanique...),

15 - des antigènes bactériens vis-à-vis desquels il existe une forte immunité dans l'espèce humaine (Escherichia-Coli, Klebsielle, flagelline de Shigelle, ou antigène de Salmonelle),

20 - des molécules possédant les séquences protéiques acceptrices de glycosylations xénogéniques peuvent également être envisagées après qu'elles aient été produites par des cellules animales possédant de fortes activités glycosyl transférase qui leur grefferont les cibles glucidiques d'anticorps naturels connus comme réagissant fortement en xénotransplantation (par exemple : groupement alpha-galactosyl, obstacle aux transplantations xénogéniques porc-homme).

Ces mini-anticorps seront utilisés comme agents de liaison érythrocytaire d'hétérochimères dont ils ne représenteront qu'une valence de type C4BP  
25 β associée à une molécule antigénique multimérique de type C4BP α heptamérique. Le système antigénique le plus efficace sera ainsi sélectionné dans un test de criblage aisément quantifiable. Il sera alors transféré dans une chimère recombinante CD4/cible antigénique dont différents ratios CD4/antigène (1CD4/7antigènes ou nCD4/M antigènes)  
30 seront testés dans un modèle d'inhibition d'infection virale in vitro.

Ces mini-anticorps seront utilisés comme agents de liaison érythrocytaire d'hétérochimères dont ils ne représenteront qu'une valence de type C4BP bêta associée à une molécule antigénique multimérique de type C4BP alpha heptamérique. Le système antigénique le plus efficace sera ainsi 5 sélectionné dans un test de criblage aisément quantifiable. Il sera alors transféré dans une chimère recombinante CD4/cible antigénique dont différents ratios CD4/antigène (1CD4/7antigènes ou nCD4/M antigènes) seront testés dans un modèle d'inhibition d'infection virale in vitro.

Les antigènes cibles les plus intéressants ont été insérés dans des 10 constructions hétéromultimériques comportant le CD4 et testés pour leur capacité à permettre la destruction de virions VIH en présence de sérum humain et de complément, le pouvoir infectieux résiduel étant évalué dans un test d'inhibition d'infection cellulaire in vitro.

Matériels et méthodes :

15 Outre les constructions citées plus haut, les techniques de transfection et de culture cellulaires utilisées ont été les suivantes :

Transfection :

Les cellules CH0-DHFR<sup>r</sup> (American Type Culture Collection, Rockville, USA) ont été transfectées selon la technique au phosphate de calcium 20 (Calcium phosphate transfection kit, 5 prime 3 prime Inc., Boulder, U.S.A).

Culture Cellulaire:

Les cellules sont cultivées en milieu HAM déficient en Hypoxanthine et Thymidine (Biochrom, Vindelle, France) avec 10 % de sérum de veau 25 dialysé (SVF GIBCO BRL, Paisley, Ecosse) et 1% de glutamine (Sigma, St Louis, USA).

Les cellules transfectées par pMAMNeo sont sélectionnées par leur capacité de résistance à la néomycine (G418, 0.7 microg/ml) (Sigma).

La production de mCR1 dans les cellules transfectées par le pMAMneo CR1-C4BP est induite par la dexamethasone (0.8 microg/ml).

30 Les inventeurs ont utilisés pour leurs expériences un appareil de cultures cellulaires en continu, en fibres creuses pour la production de protéines

recombinantes à l'échelle de quelques milligrammes ou quelques dizaines de milligrammes de protéines recombinantes. La plupart des expériences pourront être menées à partir de surnageants de culture bruts ou concentrés. Des préparations purifiées à petite échelle ont également été 5 préparées.

Les synthèses d'oligonucléotides utilisées pour les constructions vectorielles ont été effectuées pour adapter le fragment C4BP C terminal sur chaque construction. Egalement les séquences nucléotidiques ont été déterminées sur séquenceur automatique à fluorescence pour le contrôle 10 des constructions.

### Commentaires

Les protéines multimériques de l'invention, leur utilisation dans la fabrication d'un médicament à visée prophylactique ou thérapeutique, ou 15 leur utilisation comme outil de diagnostic ou de recherche sont très puissantes.

Leur utilisation peut être un outil efficace pour l'analyse de mécanismes physiologiques dans la réponse immunitaire, de même que pour comprendre la physiopathologie de certaines affections dysimmunitaires.  
20 De telles molécules doivent permettre une immuno-intervention plus sophistiquée ouvrant la possibilité de mieux étudier *in vitro* de nombreux mécanismes physiopathologiques. Dans certains cas, elle ouvrira la voie à une immuno-manipulation in vivo dans un but thérapeutique. Il s'agit donc à la fois d'outils de recherche clinique physiopathologique, d'une 25 recherche expérimentale in vitro et d'outils thérapeutiques in vivo.

BIBLIOGRAPHIE

5      1. Matsuguchi T, Okamura S, Aso T, Niho Y. Molecular cloning of the  
cDNA coding for PRP : identity of PRP as C4BP. Biochem Biophys  
Res Commun 1989 ; 1 : 139-44.

10     2. Scharfstein J, Ferreira A, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding  
protein. I. Isolation and characterization. J exp Med 1978 ; 148 : 207-  
22.

15     3. Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein II. Role in  
proteolysis of C4b by C3b-inactivator. J. Exp Med 1978; 148 : 1044-  
51.

20     4. Chung LP, Bentley DR, Reid KBM. Molecular cloning and  
characterization of the cDNA coding for C4b-binding protein, a  
regulatory protein of the classical pathway of the human complement  
system. Biochemistry 1985 : 230 : 133-41.

25     5. Monte G. Thrombosis and Haemostasis - 69 (1) 86 (1993).

6. Hillarp. A (1990) PNAS vol 87 pp 1183-1187.

20     7. Hillarp. A (1991) Scand. J. Clin. Lab. Invest. Fi, Suppl 204 : 57-69.

8. Fanger M.W. Immunomethods 1994 - P. 72 à 81 « Production and  
use of anti FcR bi-specific antibodies ».

9. Goossens D., Champomier F, Rouger Ph. and Salmon Ch. Human  
monoclonal antibodies against blood group antigens : preparation of  
a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of  
antibody of different isotypes and specificities.  
J. of immunological methods., 101, 193, 1987.

30     10. Winter G. Nature 1990 -348- P. 552-554. M. Cafferty J., Griffiths A,  
Winter G., Chiswell. « Phage antibodies filamentous phase displaying  
antibody variable domains ».

REVENDICATIONS

1. Protéine multimérique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

5 a) une molécule de fusion A, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP compris entre les acides aminés 124 et 549 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à ladite chaîne  $\alpha$ ,

10 b) une molécule de fusion B, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  de la C4BP compris entre les acides aminés 120 et 235 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à la chaîne  $\beta$ ,

les molécules en a) et b) étant associées dans leur partie C-terminale pour 15 former ladite protéine multimérique.

2. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  est compris entre les acides aminés 493 et 549 et, en ce que le fragment C-terminal de 20 la chaîne  $\beta$  est compris entre les acides aminés 176 et 235.

3. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le rapport en nombre de monomère  $\alpha$  /  $\beta$  varie entre 7/1 et 5/3, et est de préférence de 7/1.

25 4. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que les fragments hétérologues en A et en B sont issus de ligands spécifiques du système immunitaire, notamment issus de protéines lymphocytaires de surface du type CD, d'anticorps ou de 30 fragments d'anticorps, d'antigènes ou de fragments d'antigènes.

5. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que les fragments issus de protéines lymphocytaires sont le CD4, le CD8, le CD16, le CD35 (ou CR1).

5 6. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que les anticorps ou fragments d'anticorps ont une spécificité anti Rh(D).

7. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4,  
10 caractérisée en ce que les antigènes sont des antigènes vaccinants.

8. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le fragment hétérologue en A est une enzyme thérapeutique.

15 9. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :  
- en A le CD4 ou un dérivé du CD4 et;  
20 - en B le scFv d'un anticorps, notamment un anticorps neutralisant ou, un anti Rh (D).

10. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion  
25 contiennent :  
- en A un antigène, notamment un antigène vaccinant, ou une enzyme thérapeutique ou un CD35 (ou CR1) ou un anticorps, ou tout fragment de ceux-ci possédant la propriété de ligand de la molécule entière,  
- en B un anticorps ou un fragment de celui-ci ayant conservé son épitope.

11. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications

1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

- en A un immogène vaccinant et

5 - en B un CD4 ou une molécule dérivée pourvu qu'elle conserve la propriété du ligand de la molécule entière.

12. Cellules procaryotes ou eucaryotes caractérisées en ce qu'elles ont

été transduites par un ou plusieurs plasmides contenant une séquence

10 d'acide nucléique hétérologue codant pour au moins une molécule polypeptidique de fusion A et une molécule polypeptidique de fusion B.

13. Cellules selon la revendication 12 caractérisées en ce que les cellules ont été soit,

15 - co-transduites par deux plasmides distincts, soit

- transduites par un premier plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide, soit ,

20 - résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par un plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par un plasmide codant pour le deuxième polypeptide.

14. Cellules selon l'une des revendications 12 ou 13 caractérisées en

ce que le premier plasmide est celui déposé le 12 juillet 1995 à la

25 C.N.C.M. sous le N° I-1610 et le deuxième plasmide est celui déposé à la C.N.C.M; le 12 juillet 1995 sous le N° I-1611.

15. Procédé de préparation d'une protéine multimérique définie dans

l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il

30 comprend au moins les étapes suivantes :

- la transduction de lignées cellulaires cibles par au moins un plasmide contenant chacune une séquence hétérologue codant respectivement pour une chaîne A ou B selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,
- l'expression et isolement des chaînes hétérologues A et B,
- 5 - la mise en milieu oxydant desdits polypeptides dans des proportions déterminées,
- l'isolement des multimères.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que les lignées  
10 transduites ont été soit :

- co-transduites par deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou
- sur-transduites par deux plasmides, deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou  
15 - résultent de la fusion de cellules ayant respectivement été transduites par un plasmide porteur d'une séquence d'ADN codant pour le polypeptide A et par un plasmide porteur d'une séquence d'ADN codant pour le polypeptide B.

20 17 Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament destiné à la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle.

25 18. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament destiné à la thérapeutique ou à la prophylaxie des infections virales, bactériennes ou parasitaires.

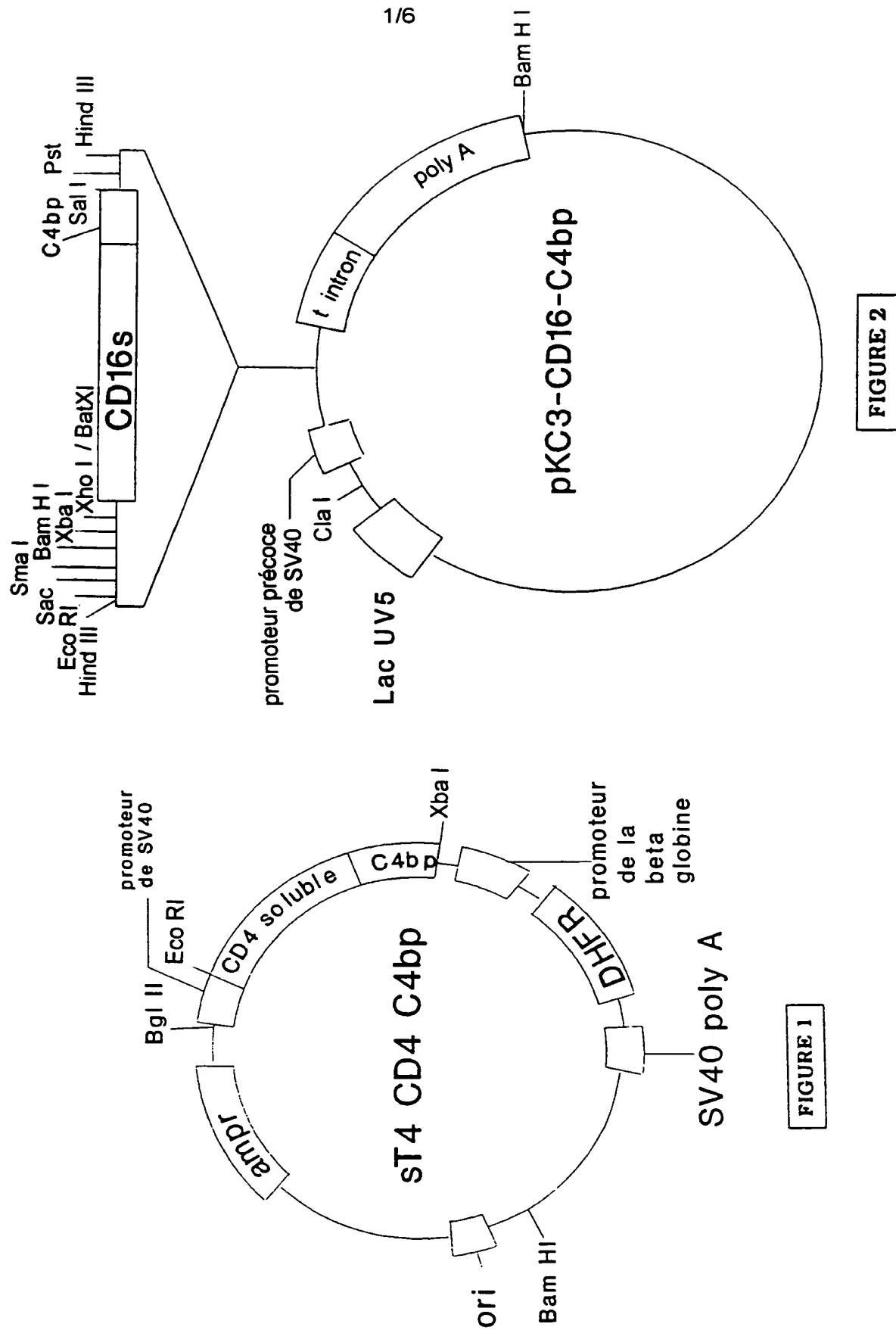
30 19. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament

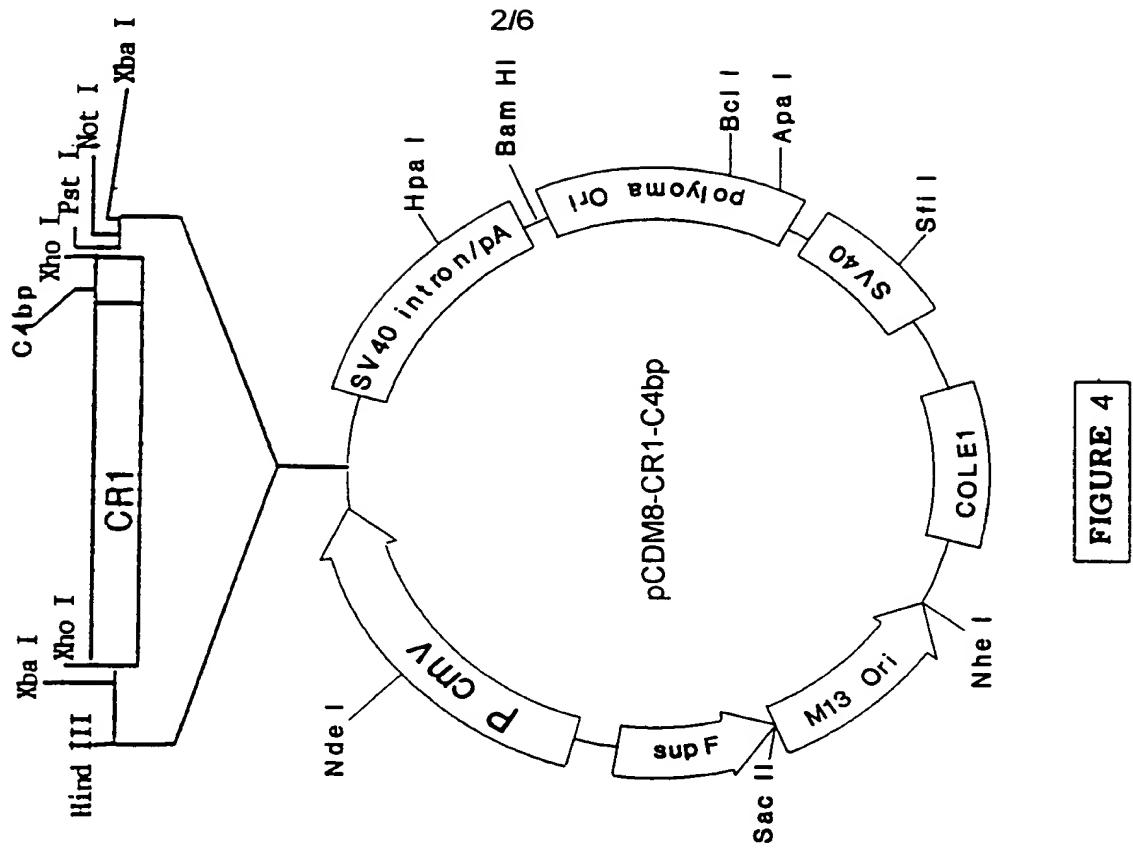
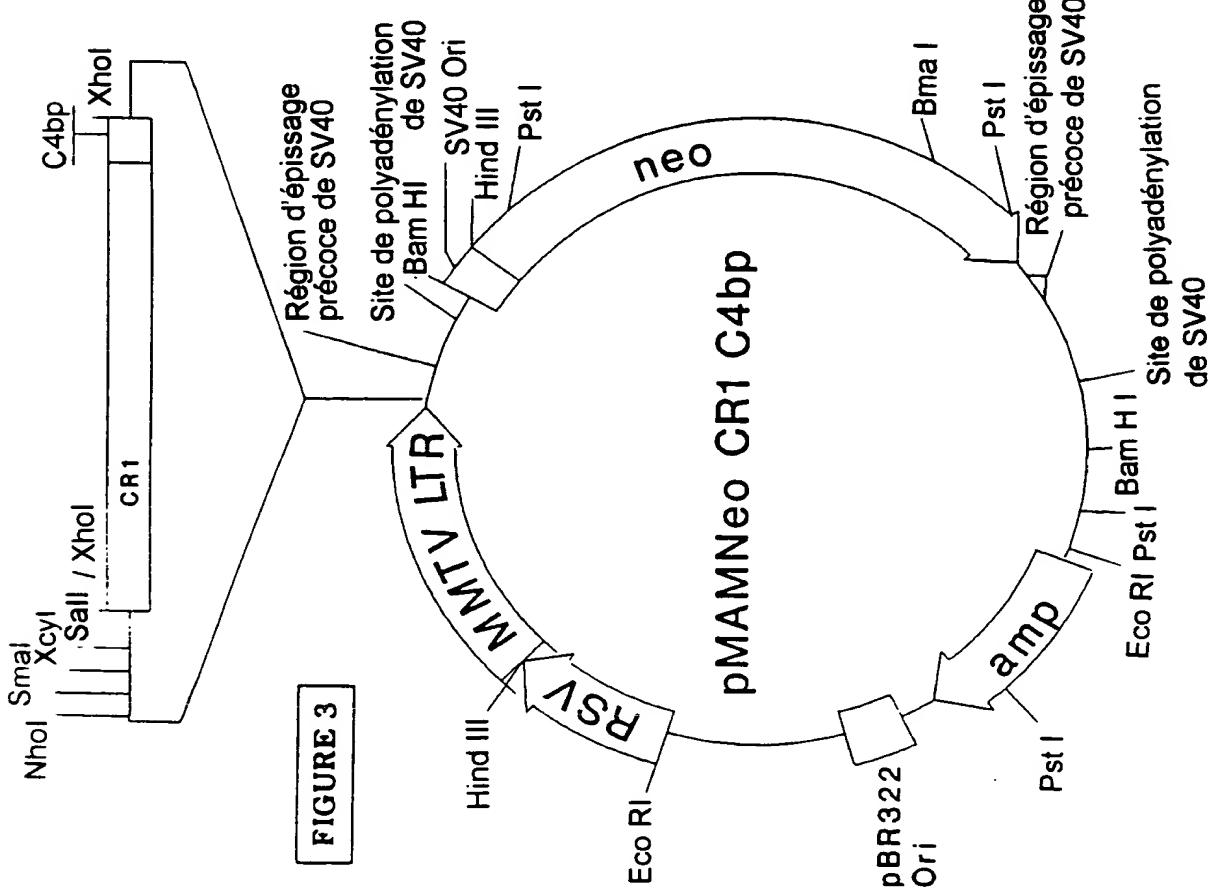
destiné à la thérapeutique des maladies auto-immunes et notamment le lupus erythémateux disséminé.

20. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une 5 quelconque des revendications 1 à 11 dans un test de diagnostic nécessitant l'intervention d'au moins deux ligands différents.

21. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend 10 en tant que principe actif une protéine multimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ladite composition pharmaceutique permettant une immuno-thérapie ou une immuno-prévention de pathologies liées notamment aux infections virales, bactériennes, aux maladies auto-immunes ou allo-immune.

1/6

**FIGURE 1**



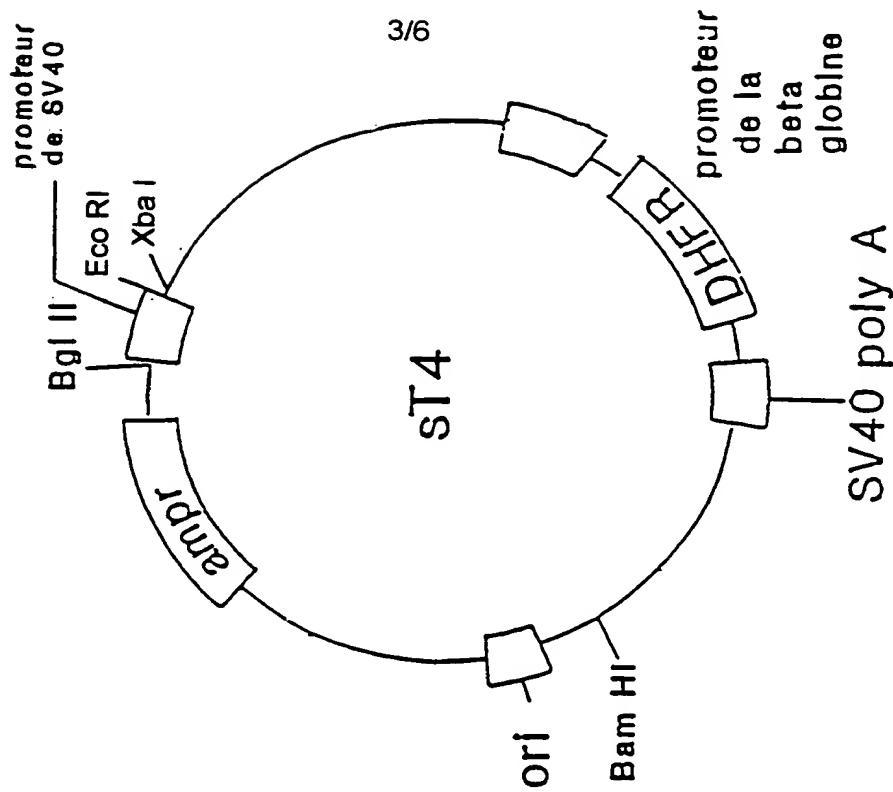


FIGURE 6

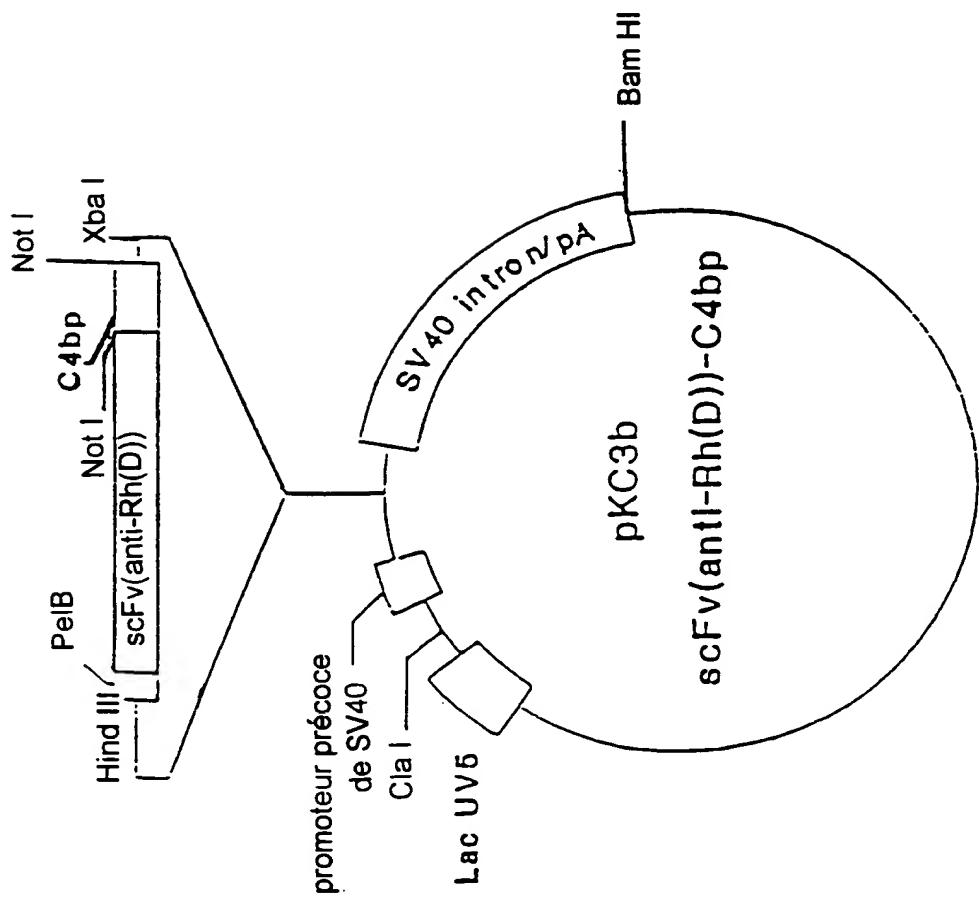


FIGURE 5

4/6

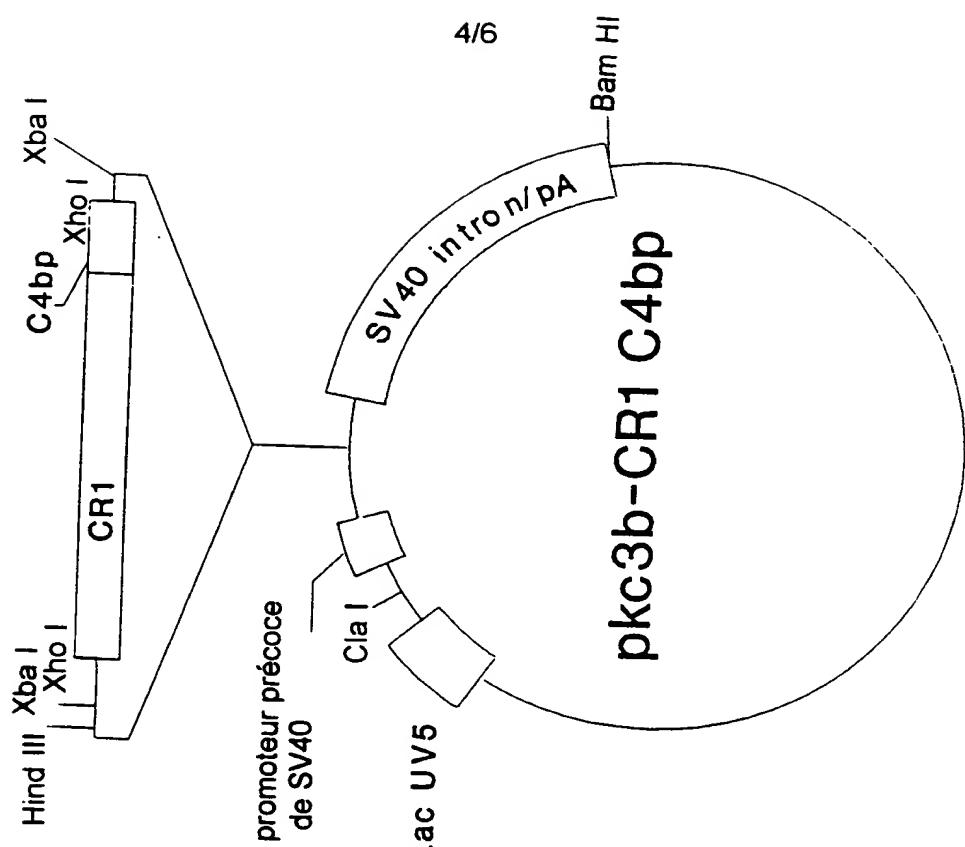


FIGURE 8

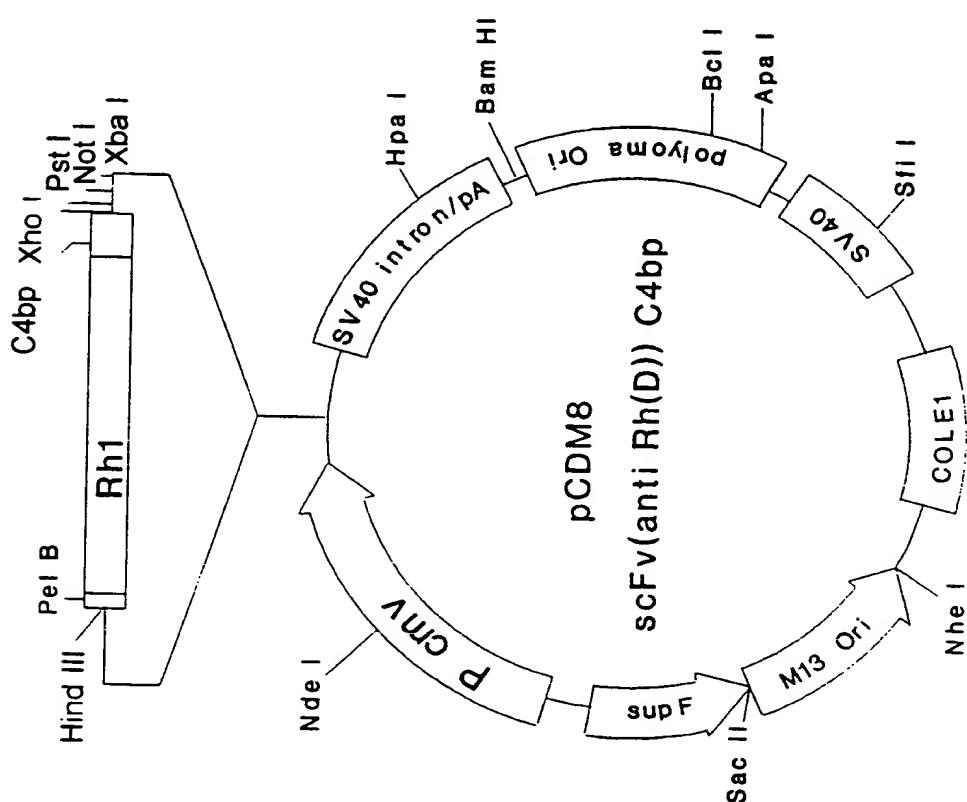


FIGURE 7



A

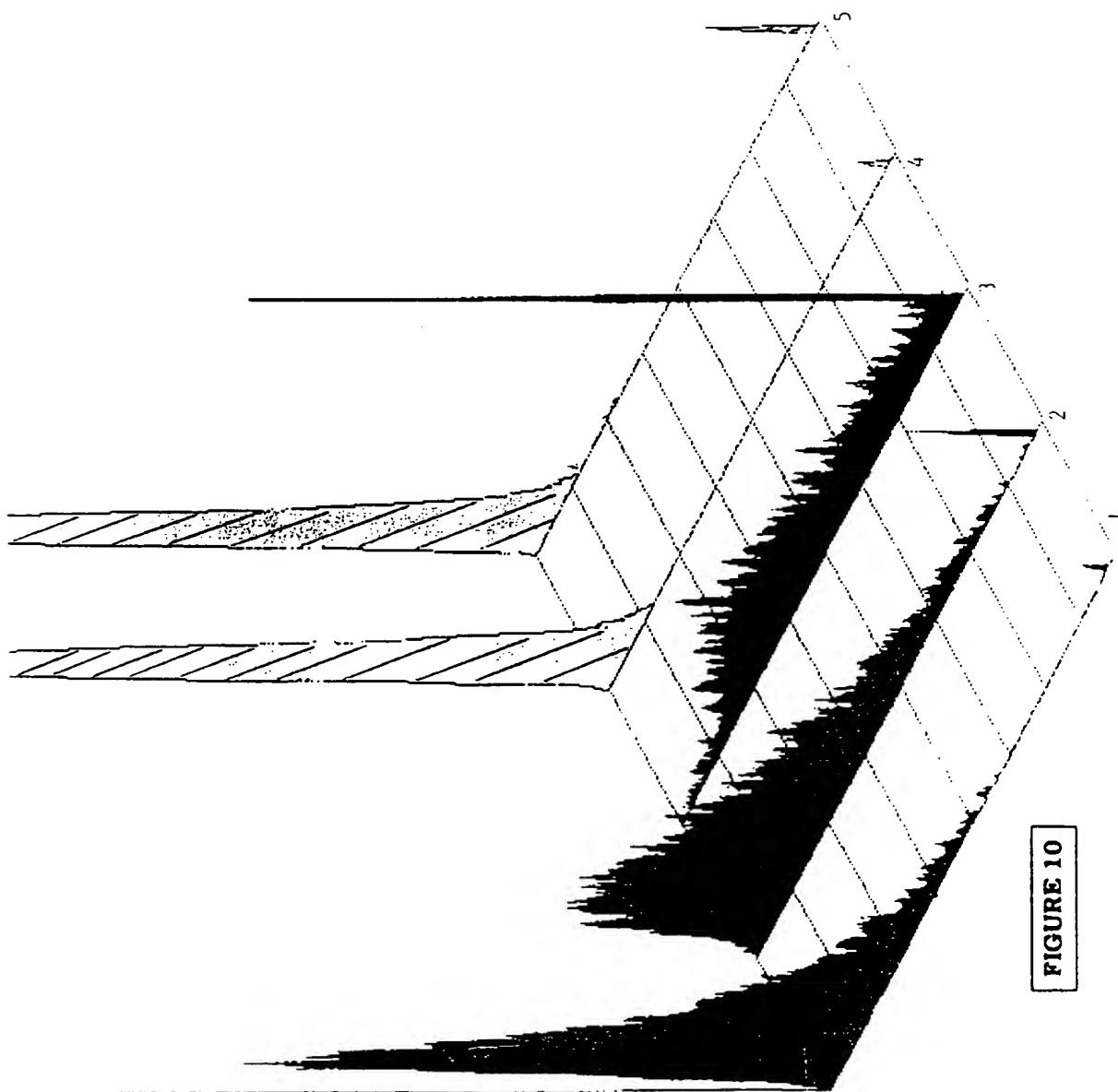
B

C

D

**FIGURE 9**

6/6



**FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/01132

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/62 C07K14/47 A61K38/17 C12N5/10 C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J BIOL CHEM, FEB 15 1993, 268 (5) P3033-6, UNITED STATES, XP002013808 ANDERSSON A ET AL: "High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in Escherichia coli." see the whole document --- WO,A,91 11461 (BIOGEN INC) 8 August 1991 cited in the application see the whole document -----	1,12,15, 17,21
A		1,12,15, 17,21

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

20 September 1996

Date of mailing of the international search report

27.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

**PCT/FR 96/01132**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9111461	08-08-91	AU-A-	7328891	21-08-91
		EP-A-	0465633	15-01-92
		JP-T-	4506460	12-11-92

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 27 février 1997 (27.02.97)	
Demande internationale no PCT/FR96/01132	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B2892A - FL
Date du dépôt international (jour/mois/année) 18 juillet 1996 (18.07.96)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 juillet 1995 (21.07.95)
Déposant KLATZMANN, David etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

14 février 1997 (14.02.97)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

---

2. L'élection  a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé N. Lindner no de téléphone: (41-22) 730.91.11
--	--

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA  
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date d'expédition (jour/mois/année)

25 mars 1998 (25.03.98)

en sa qualité d'office élu

Demande internationale no

PCT/FR96/01132

Date du dépôt international

18 juillet 1996 (18.07.96)

Déposant

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3a))

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

C. Carrié

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B2892A - FL	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° PCT / FR 96 / 01132	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18/07/96	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 21/07/95
Déposant UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE ..... et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1.  Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
2.  Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
3.  La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence.
  - déposé avec la demande internationale
  - fourni par le déposant séparément de la demande internationale
    - sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
  - transcrit par l'administration
4. En ce qui concerne le titre,  le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
  - Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
5. En ce qui concerne l'abrégié,
  - le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
  - le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégié est la suivante:  
 Figure n° \_\_\_\_\_
  - suggérée par le déposant.
  - parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
  - parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 96/01132

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/62 C07K14/47

A61K38/17

C12N5/10

C12N1/21

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J BIOL CHEM, FEB 15 1993, 268 (5) P3033-6, UNITED STATES, XP002013808 ANDERSSON A ET AL: "High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in Escherichia coli." voir le document en entier ---	1,12,15, 17,21
A	W0,A,91 11461 (BIOGEN INC) 8 Août 1991 cité dans la demande voir le document en entier -----	1,12,15, 17,21

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20 Septembre 1996

27.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01132

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9111461	08-08-91	AU-A- 7328891 EP-A- 0465633 JP-T- 4506460	21-08-91 15-01-92 12-11-92

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B2892A - FL	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR96/01132	International filing date (day/month/year) 18 July 1996 (18.07.1996)	Priority date (day/month/year) 21 July 1995 (21.07.1995)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/62, C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/10, 1/21		
Applicant UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 February 1997 (14.02.1997)	Date of completion of this report 13 June 1997 (13.06.1997)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_  
 the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01132

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19 and 21	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The following documents (D) have been taken into account in drawing up the preliminary examination report:

D1: WO 91/11461

D2: J.B.C., 268(5), 1993, pp.3033-36.

I) Document D1 (considered as the closest prior art among the documents cited in the international search report) describes C4BP-type recombinant multimeric proteins consisting only of alpha monomers in which the N-terminal parts have been substituted by heterologous peptides, in particular by fragments of CD4 protein.

Although D1 (page 4, lines 12-21) refers to the existence of an other 45kD sub-unit (corresponding to the beta chain) linked to C4BP, the constructions described in this document use only the alpha chain.

D1, considered alone or combined with D2, neither discloses nor suggests the subject matter of the present application, i.e. C4BP-type recombinant multimeric proteins consisting not only of alpha monomers in which the N-terminal parts have been substituted by heterologous polypeptides but also of beta monomers in which the N-

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 96/01132

terminal parts have been substituted by heterologous polypeptides.

Thus, the subject matter of the present application complies with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

II) The PCT does not contain uniform criteria for determining whether claim 20 (which does not exclude use in vivo) is industrially applicable. Patentability can also depend on the way in which the claim is worded. Thus, the European Patent Office does not consider the subject matter of claims of use of a compound for medical purposes to be industrially applicable. By contrast, claims relating to a known compound will be accepted for a first use for medical purposes, as will claims relating to the use of such a compound in the manufacture of medication with a view to a new form of medical treatment.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- 1) Claim 12 does not meet the requirements stemming from the combined provisions of PCT Article 6 and PCT Rule 6.3(a), according to which a claim shall define the subject matter for which protection is sought in terms of technical features of the invention. The fusion polypeptides A and B are not actually defined.
- 2) In claims 1 and 2, the expression "fragment...(is) included between the amino acids ... and ..." is vague and ambiguous, since it does not exclude very short fragments (1 or 2 amino acids) which are not at all characteristic of the alpha or beta chains. This gives rise to doubt as to the true subject matter of the claims. The requirement of clarity contained in PCT Article 6 is not therefore satisfied.
- 3) As part of the present application, a monomer does not consist of alpha or beta but of an A or B fusion molecule (see claim 3).
- 4) In claims 9 and 10, "the fusion polypeptide fragments" do not correspond to any feature defined in claims 1 to 3.
- 5) It appears that the term "transduces" (claims 12-13 and 15-16) is inappropriate, since it applies to viruses and not to plasmids.
- 6) The wording of claim 15 (page 27, lines 1 to 3) is

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 96/01132

**VIII. Certain observations on the international application**

unclear. Transduction as described in this passage does not allow "the expression and isolation of the heterologous chains A **and** B". It should be noted that the corresponding passage of the description (page 8, lines 9 to 18) is not consistent with claim 15.

7) In claim 16, obtaining over-transduced lineages involves two stages (see page 8, lines 23 to 25 of the description). This is not clear from the wording used.

(6)

1

PROTEINES HETERO-MULTIMERIQUES RECOMBINANTES  
DU TYPE  $\alpha$  -  $\beta$  C4BP

5 La présente invention porte sur des protéines de fusion hétéro-multimériques de type C4BP, les compositions les contenant ainsi que leur procédé de préparation. Plus particulièrement, cette invention est relative à des protéines de fusion hétéro-multimériques issues de l'association de monomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine C4BP ou de fragments de ceux-ci, ces  
10 monomères étant fusionnés à des polypeptides issus de protéines à activité fonctionnelle ayant des propriétés de ligand ou de récepteur.

Les numéros entre parenthèse sont relatifs à la liste bibliographique en fin de texte.

La « C4BP- binding protein » (C4BP) appelée auparavant protéine riche en  
15 proline, est une protéine importante à la fois dans le système de la coagulation (1), et dans le système du complément (2, 3). La forme majoritaire de la C4BP est composée de 7 chaînes  $\alpha$  identiques de 75 Kd et d'une chaîne  $\beta$  de 45 Kd. La séquence de nucléotide du cDNA et la séquence protéique de la chaîne  $\alpha$  ont été déterminées (4). Une  
20 description complète de la C4BP humaine, son isolement et sa caractérisation ont été décrits dans (2) ; une mise à jour des connaissances sur cette molécule a été synthétisée dans (5).

L'existence des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  était inconnue jusqu'en 1990, ce n'est qu'en 1990 que A. Hillarp a mis en évidence pour la première fois  
25 l'existence dans la protéine multimérique une nouvelle sous-unité désignée chaîne  $\beta$ , et qui contient le site de liaison à la protéine S (6, 7).

La demande de brevet BIOGEN WO 91/1146 décrit des protéines multimériques du type C4BP uniquement constituées de monomères  $\alpha$  dans lesquels la partie N-terminale a été substituée par un fragment de la  
30 protéine CD4.

Cependant, les constructions décrites dans ce document ne mettent en oeuvre que la chaîne  $\alpha$ , la chaîne  $\beta$  étant inconnue à cette époque. L'inconvénient de ces constructions est qu'il est extrêmement difficile de contrôler l'état physique de la molécule synthétique c'est-à-dire le nombre 5 de monomères qui s'associent d'une part, et d'autre part lorsque l'on souhaite associer au sein du multimère deux parties fonctionnelles différentes, de contrôler les proportions de ces éléments fonctionnels.

Des agents thérapeutiques ayant une fonction au niveau du système immunitaire, qu'il soit cellulaire ou humorale, ou agent d'immuno-intervention, se sont développés dans de nombreuses directions ; les champs d'application des immuno-interventions thérapeutiques des anticorps surtout des anticorps monoclonaux restent cependant aujourd'hui modestes, du fait de la mauvaise maîtrise des phénomènes survenants après leur liaison cellulaire. En effet, même 10 humanisés, on ne sait aujourd'hui utiliser ces anticorps qu'à des fins de destruction cellulaire.

Le développement d'anticorps bi-spécifiques a également été envisagé et certains d'entre eux comportent une partie susceptible de se lier à un antigène et l'autre partie ayant une qualité de ligand vis-à-vis d'un 20 récepteur permettant d'effectuer le routage vers un système cellulaire (8). Cependant, ces systèmes ne permettent pas d'associer plusieurs ligands dans un même complexe, ce qui dans certains cas semble nécessaire au déclenchement d'une réponse immunitaire.

Un autre système multimérisant proposé repose sur le Fc de l'IgM ; il 25 possède plusieurs inconvénients : le principal est de réaliser des espèces moléculaires de tailles variables laissant des résidus sulfhydryles libres capables de réagir avec des molécules plasmatiques ou des surfaces cellulaires. En outre, les fonctions du fragment Fc de liaison au récepteur cellulaire et d'activation du complément peuvent être indésirables.

30 Un molécule hétéro-multimérique recombinante peut permettre au contraire d'associer plusieurs fonctions anticorps, ou plusieurs molécules

d'enzymes ou plusieurs antigènes ou des fragments ou des mélanges de ceux-ci, réalisant un traceur multi-valent ayant un meilleur potentiel d'amplification du signal détecté en comparaison d'une protéine de fusion associant un seul anticorps ou un anticorps bi-spécifique et une molécule enzymatique ou antigénique.

Cette approche peut permettre d'envisager, outre l'opsonisation par déclenchement de l'immunité cellulaire, la mise en oeuvre provoquée de l'immunité humorale par l'activation du complément.

L'objectif de la présente invention est donc de développer des molécules chimériques recombinantes solubles hétéro-multimériques associant des fonctions différentes dans une même molécule, dans une perspective d'immuno-intervention en pathologie dysimmunitaire humaine. Ces molécules permettront d'intervenir dans les mécanismes physiopathologiques des différentes affections, notamment dans les domaines relatifs :

- à la pathologie du transport et de l'élimination des complexes immuns par les erythrocytes, avec une application notamment au Lupus érythémateux disséminé, ou aux infections VIH,
- à la capture des antigènes médiée par les récepteurs Fc en surface des cellules de la lignée monocyte-macrophage,
- à la modulation par des molécules à activité CD16 soluble,
- à la prévention de l'allo-immunisation anti Rh(D) érythrocytaire,
- à l'inhibition de la pénétration cellulaire du virus VIH à l'aide de formes solubles de CD4, d'anticorps dirigés contre les constituants du virus, et/ou de molécules à fonctions enzymatiques.

La présente invention porte sur une protéine multimérique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

- a) une molécule de fusion, de nature polypeptidique A constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP compris entre les

acides aminés 549 et 124, et d'un fragment polypeptidique hétérologue à ladite chaîne  $\alpha$ ,

b) une molécule de fusion B, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  de la C4BP compris entre les acides aminés 235 et 120, et d'un fragment polypeptidique hétérologue à la chaîne  $\beta$ ,

Les acides aminés 549 ou 235 représentant respectivement les extrémités C-terminales des molécules de fusion, les fragments hétérologues étant fusionnés par leur extrémité N-terminale au résidu des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$

respectivement, les molécules en a) et b) étant associées entre elles par leur partie C terminale pour former ladite protéine multimérique.

Préférentiellement, une protéine multimérique recombinante selon l'invention est caractérisée en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  est compris entre les acides aminés 549 et 493 et, en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  est compris entre les acides aminés 235 et 176.

La réassociation des molécules de fusion est réalisée par la formation de points disulfures entre les cystéines en position 498 et 510 de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$ , et les cystéines en position 199 et 185 de l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\beta$ .

Toute chimère entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  associant le cas échéant une cystéine de la chaîne  $\alpha$  et une cystéine de la chaîne  $\beta$  dans la molécule de fusion A, ou B, ou dans les deux, entre également dans la portée des constructions des protéines multimériques de l'invention.

Notamment, la possibilité de modifier l'espacement entre les deux cystéines peut permettre de modifier le nombre de monomères entrant dans la constitution du multimère.

A titre d'illustration, une augmentation de la distance entre les cystéines peut conduire à une augmentation du nombre de monomères entrant dans le multimère ; en revanche, une diminution de cette distance entraînerait une diminution de ce nombre. Dans certains cas, il peut être avantageux

de modifier cette distance de telle façon à modifier la réassocation contrôlée des deux types de chaînes porteuses d'un ligand ou d'un récepteur, quant à leur nombre et à leur proportion.

Dans la présente invention, il a été mis au point un système multimérisant

5 permettant d'obtenir des formules hepta et octamériques à l'aide de l'extrémité C-terminale des chaînes élémentaires de la molécule C4BP. La multimérisation de molécules dont l'extrémité C terminale a été remplacée par la partie C-terminale de la C4BP  $\alpha$  ou de la C4BP  $\beta$ , fournit une forme octamérique.

10 En tout état de cause, le fragment issu de la chaîne  $\beta$  de la C4BP doit être dépourvu des sites de fixation à la protéine S, lesquels sites se situent au niveau des deux SCR de la partie proximale de l'extrémité N-terminale de la chaîne  $\beta$ .

Ainsi, une protéine multimérique recombinante selon l'invention est  
15 caractérisée en ce que le rapport en nombre de monomères  $\alpha$  /  $\beta$  varie entre 7/1 et 5/3, et est de préférence de 7/1 quand les fragments des parties C-terminales ont une provenance homogène dans les fragments A et B ci-dessus.

Idéalement, la molécule recombinante multimérisante est une protéine  
20 n'associant que des constituants humains, évitant ainsi toute immunisation xénogénique, et n'activant pas le complément sauf fonctions spécifiques ajoutées intentionnellement dans ce sens. Une telle molécule ne doit pas interagir avec des récepteurs cellulaires ou des molécules plasmatiques et assurer ainsi une meilleure activité à la molécule chimérique par sa multivalence, ainsi qu'une plus longue durée de vie.

Une protéine multimérique selon la présente invention présente des propriétés relatives à l'immuno-intervention, notamment une capacité à moduler l'activité du complément aux fins de générer une opsonisation de manière artificielle. C'est par le caractère hétérofonctionnel que l'on peut

attribuer à cette protéine, grâce à l'apport de fragments N-terminaux hétérologues, que ce résultat est obtenu.

A ces fins, une protéine recombinante conforme à l'invention est caractérisée en ce que les fragments hétérologues en A et en B sont issus

5 de ligands spécifiques du système immunitaire, notamment de protéines lymphocytaires de surface du type CD, des anticorps ou de fragments d'anticorps, des antigènes ou de fragments d'antigènes ; les fragments hétérologues en A et B peuvent, selon l'application que l'on souhaite donner à la protéine recombinante, être choisis, sans caractère exhaustif,

10 parmi les polypeptides à activité de ligands suivants :

i) - des fragments issus de protéines lymphocytaires sont le CD4, le CD8, le CD16, le CD35 (ou CR1),

ii) - des anticorps ou fragments d'anticorps ont une spécificité anti-erythrocytaire et notamment anti Rh(D),

15 iii) - des antigènes, notamment des antigènes vaccinants, comme le pré-S2 du virus de l'hépatite B,

iv) - une enzyme à visée thérapeutique ou plus particulièrement le fragment de cette enzyme correspondant au site actif dudit enzyme, qui peut être fusionné avec la partie C-terminale de la chaîne alpha pour former le fragment A, le fragment B pouvant alors être constitué

20 par tout type de polypeptide tel que cité en i) à iii).

Encore plus particulièrement, des combinaisons de A et B particulièrement avantageuses pour mettre en oeuvre l'immuno-intervention de l'invention peuvent être des protéines multimériques dans lesquelles les fragments

25 polypeptidiques de fusion contiennent :

v) - en A le CD4 ou, un dérivé du CD4 et,

- en B le sc Fv d'un anti Rh(D) ou d'autres anticorps notamment des anticorps neutralisants, ou des cibles antigéniques.

Une autre construction avantageuse est une protéine multimérique dans

30 laquelle les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

- en A un antigène, notamment un antigène vaccinant ou une enzyme thérapeutique ou un CD35 (ou CR1) ou un anticorps, ou tout fragment de ceux-ci possédant la propriété de ligand de la molécule entière ;

5      - en B un anticorps ou un fragment de celui-ci ayant conservé son épitope ;

Une autre protéine multimérique recombinante avantageuse sont celles dans lesquelles les fragments polypeptidiques de fusion contient :

- en A un immogène vaccinant et

10     - en B un CD4 ou une molécule dérivée pourvu qu'elle conserve la propriété du ligand de la molécule entière.

En outre, la présente invention vise les cellules eucaryotes ou procaryotes transduites par un ou plusieurs plasmides contenant une séquence d'acide nucléique hétérologue et codant au moins pour une molécule polypeptidique de fusion A et une molécule polypeptidique de fusion B.

15     Les différentes lignées cellulaires qui peuvent être utilisées pour être transduites par des plasmides sont de préférence des cellules eucaryotes susceptibles de réaliser la glycosylation post-traductionnelle ; on peut citer à titre d'exemple, des levures ou des cellules de lignées animales telles

20     des cellules de types fibroblastiques, comme les BHK ou les CHO, ou encore des lignées lymphocytaires comme des lymphocytes immortalisés.

Selon différentes réalisations de la présente invention, les cellules peuvent être :

- co-transduites par deux plasmides distincts, ou

25     - transduites par un plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide ou,

- résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par le plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par

30     un plasmide codant pour le deuxième polypeptide.

Les fusions de cellules sont réalisées par des méthodes classiques, soit par action du PEG (polyéthylène glycol), ou encore par action du virus Epstein-Barr, ou toute autre méthode classique pour fusionner deux cellules eucaryotes différentes.

5 Plus particulièrement, lesdites cellules peuvent être transduites par le premier plasmide qui est celui déposé le 12 juillet 1995 à la C.N.C.M. sous le N° I-1610 et par le deuxième plasmide qui est celui déposé à la C.N.C.M; le 12 juillet 1995 sous le N° I-1611.

La présente invention concerne également un procédé de préparation  
10 d'une protéine multimérique selon l'invention. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- la transduction de lignées cellulaires cibles par au moins un plasmide contenant une séquence hétérologue codant pour une chaîne A ou B, telles que définies ci-dessus,
- 15 - l'expression et l'isolement des chaînes hétérologues A ou B,
- la mise en milieu oxydant desdits polypeptides, dans des proportions déterminées,
- l'isolement des multimères.

De préférence, ce procédé de préparation est caractérisé en ce que les  
20 lignées transduites ont été soit :

- co-transduites par deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou
- transduites par un plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide, ou ,
- résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par le plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par un plasmide codant pour le deuxième polypeptide.

Par ailleurs, la présente invention porte sur l'utilisation d'une protéine  
30 recombinante telle que précédemment définie, dans la fabrication d'un médicament, et plus particulièrement, d'un médicament destiné à :

- la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle ou,
- la thérapeutique, ou la prophylaxie des infections virales, bactériennes ou parasitaires,
- la thérapeutique des maladies auto-immunes et notamment le lupus erythémateux disséminé, ou les maladies allo-immunes.

5 De façon plus générale, la présente invention porte sur l'utilisation d'une protéine recombinante telle que précédemment définie dans la fabrication d'un médicament permettant, selon la fonctionnalité attribuée aux ligands, ou aux récepteurs, une immuno-intervention notamment dans 10 l'opsonisation ou la non-opsonisation de cellules cibles, par activation, modulation ou inhibition du complément.

15 L'homme du métier saura, au fur et à mesure de la découverte des fonctionnalités de certaines protéines ou de certains ligands ou récepteurs, construire une protéine multimérique recombinante selon l'invention la mieux adaptée à l'effet recherché.

Avantageusement, l'utilisation de la protéine multimérique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle permet une activation du complément suffisante à provoquer l'opsonisation de cellules dont les sites 20 antigéniques ou épitopiques ne sont pas naturellement susceptibles de déclencher une telle activation.

Entre également dans le cadre de la présente invention une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend en tant que principe actif une protéine multimérique recombinante telle que décrite ci-dessus. Ladite composition pharmaceutique peut permettre une immuno-thérapie 25 ou une immuno-prévention de différentes pathologies notamment celles liées aux infections virales, bactériennes, aux maladies auto-immunes ou allo-immunes.

Une protéine recombinante selon l'invention est également utilisable dans un test de diagnostic nécessitant l'intervention d'au moins deux ligands ou 30 récepteurs différents.

La faisabilité du multimère de très haut poids moléculaire a été vérifiée dans un modèle de multi CR1 (env. 1,5 million daltons). Cette molécule est fonctionnelle et inhibe l'activation du complément dans un modèle de lyse dépendante du complément, d'erythrocytes recouverts d'anticorps, à des 5 concentrations inférieures à celles requises pour le CR1 soluble monomérique.

La faisabilité d'hétéro-chimères associant différentes fonctions a été établie ensuite en utilisant, d'une part l'anticorps anti Rh(D), et plus particulièrement la partie variable Fv de cet anticorps et plus 10 particulièrement encore la partie simple chaîne de cette partie variable appelée scFv, dans le cas présent associée à la molécule CD35 ou (CR1) susceptible d'inhiber ou de moduler l'activité du complément ; l'autre système utilisé est un système hétéro-multimérique de type CD4/antigène. Les exemples qui suivent, n'ont aucun caractère limitatif et ne servent qu'à 15 démontrer la faisabilité des constructions de ces hétéro-multimères recombinants à des fins d'immuno-intervention ; les figures qui illustrent les exemples ont les significations suivantes :

- la figure 1 représente un vecteur d'expression constitué d'un plasmide contenant la séquence codant pour le CD4 et appelée sT4CD4-C4 BP ;
- 20 - la figure 2 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le CD16 multimérique .
- la figure 3 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le CR1 multimérique ;
- 25 - la figure 4 représente un autre vecteur plasmidique, pCDM8, codant pour le même CR1 multimérique ;
- la figure 5 représente un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) multimérique ;
- la figure 6 représente un autre vecteur plasmidique, pST4, contenant la même séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) ;
- 30 - la figure 7 représente un troisième vecteur plasmidique contenant cette même séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D) ;

- la figure 8 représente un vecteur plasmidique de type pKC3B contenant la séquence codant pour le CR1-multimérique.

Dans toutes ces figures, les enzymes de restriction permettant l'insertion de la séquence hétérologue sont indiqués par leur nomenclature

5 classique.

- la figure 9 représente le résultat obtenu avec le scFv multimérique sur l'agglutination des globules rouges présentant ou ne présentant pas l'antigène Rhésus. Le tube en A représente le témoin positif dans lequel les globules rouges O Rh+ sont agglutinées par un anticorps monoclonal

10 anti R(h) natif ; le tube B représente le témoin négatif dans lequel des globules rouges O Rh- ne sont pas agglutinées par le scFv anti R(h) des multimériques ; le tube C représente l'essai dans lequel des globules rouges O Rh+ et scFv anti Rh+ sont agglutinées ; le tube D est un autre témoin négatif dans lequel des globules rouges O Rh- sont mis en

15 présence d'un milieu de culture sans anticorps.

- la figure 10 représente le profil obtenu en cytométrie de flux après fixation erythrocytaire d'une hétéro-chimère anti Rh(D) -CR1.

Cinq pistes sont représentées dans lesquelles :

- la première piste représente des globules rouges O Rh+ non papaïnés

20 avec une densité de CR1 de 180 sites ;

- la deuxième piste représente des globules rouges O Rh+ non papaïnés avec une densité de CR1 de 550 sites ;

- la troisième piste représente des globules rouges O Rh+ papaïnés, qui ont perdu leur densité de 180 sites de CR1 ; ces erythrocytes reconstitués en CR1 à l'aide de l'hétéro-chimère scFv anti Rh+/CR1 expriment la densité supra physiologique de 1 200 sites CR1 par erythrocyte ;

- les pistes 4 et 5 représentent des témoins dans lesquels pour la piste 4, sont des globules rouges O Rh+ papaïnés, et pour la piste 5, sont des globules rouges O Rh- papaïnés traités avec l'hétéro-chimère scFv anti

30 Rh(D)/CR1.

### I - Construction des chaînes CR1 - C4 BP

L'avantage d'utiliser le CR1 dans une construction multimérique selon l'invention résulte des travaux des inventeurs sur le devenir physiologique du CR1 chez le sujet normal. Ils ont pu ainsi déterminer les paramètres 5 d'un catabolisme physiologique du CR1 érythrocytaire et ses relations avec le polymorphisme génétique de densité de CR1 érythrocytaire. Ils ont pu également préciser le catabolisme du CR1 érythrocytaire chez les patients lupiques, c'est-à-dire souffrant d'un lupus erythémateux disséminé. La distribution parmi les patients lupiques et les sujets 10 normaux des différents génotypes du polymorphisme de longueur et de nombre de sites de liaison C3b/C4b de CR1 a également été étudiée. Des molécules de CR1 recombinantes permettant de modifier la densité de CR1 érythrocytaire pour restaurer leur état physiologique ou réaliser des érythrocytes "armés" de densités "supra-physiologiques" de CR1 ont 15 ensuite été préparées. Le potentiel du CR1 soluble a été démontré dans différents modèles en particulier d'ischémie myocardique expérimentale et de phénomène d'Arthus. Une molécule de CR1 soluble multimérique est produite, et son pouvoir anti-inflammatoire, sa durée de vie plasmatique ainsi que son espace de distribution sont étudiés chez l'animal. Un 20 couplage chimique aux érythrocytes de monomères réduits par leur groupement SH libre est réalisée. Des érythrocytes sont ainsi armés de densités supraphysiologiques de CR1 présentés de façon fonctionnelle, et leur capacité de liaison de complexes immuns artificiels antigène Hbs/anticorps antiHbs opsonisés par du C3b est alors étudiée .

25 Les résultats obtenus avec un anti Rh(D) sont montrés dans l'exemple I ci-après.

Les constructions utilisées pour réaliser la transduction C4 BP - CR1 sont représentées dans les figures 3,4 et 8 dans les plasmides pMAMneo, pCDM8 et pKC3b.

a) Construction de pMAMneo CR1-C4BP :

L'ADN complémentaire codant pour le CR1 avait été inséré aux sites *Xho I* et *Not I* dans le plasmide pCDM8 (dû à l'obligeance de T. J. Bartow, D. T. Fearon et W. Wong, John Hopkins Hospital, Baltimore, U.S.A.).

5 La séquence codant pour la partie extra-membranaire du CR1 est extraite par digestion de ce plasmide par les enzymes de restriction *Xho I* et *Bal I*. La partie C terminale de la C4BP est amplifiée par les amores 5'-GAGACCCCCGAAGGGCTGTGA-3', et 5'- CTCGAGTTATAGTTCTTATCCCAAGTGG-3',

10 cette deuxième amorce contenant un codon stop et un site de restriction *Xho I*.

Les séquences codant pour la partie C terminale de la C4BP et pour la partie extra-membranaire du CR1 sont insérés dans pMAMNea (Clontech, Palo Alto, USA) au site *Xho I* (figure 3) CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pCDM8 (Invitrogen, San Diego, USA).

15 b) Construction pCDM8 CR1-C4BP :

La séquence codant pour la protéine de fusion CR1-C4BP a été extraite de pMAMNeo CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pCDM8 (Invitrogen, San Diego, USA) (figure 4).

20 c) Construction pKC3b CR1-C4BP :

La séquence codant pour la protéine de fusion CR1-C4BP a été extraite de pMAMNeo CR1-C4BP par digestion par *Xho I*, et insérée dans le plasmide pKC3b (figure 8).

25 II - Construction du multimère recombinant :

Un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP a été recopié par PCR à partir de DNA génomique. Il figure dans un seul exon. La taille minimale se situe au-delà de la deuxième cystéine en partant de l'extrémité C-terminale, la taille optimale se situe quelques acides aminés au-delà, réalisant un espaceur de 5 à 10 acides aminés, soit au total 58 AA.

La taille maximale choisie est de 6 SCR pour éviter le site de liaison C3b-C4b. Ce fragment maximal est synthétisé à partir d'un cDNA du mRNA de la C4 BP, puisqu'il comporte plusieurs exons. Le fragment optimal de la partie C-terminale de la C4 BP est recopié à nouveau par PCR à l'aide  
5 d'amorces pourvues à leurs extrémités de bras comportant les sites de restriction enzymatique adéquats pour un montage dans un vecteur donné comportant déjà le gène de la protéine que l'on souhaite multimériser. Un site enzymatique proche de la partie C-terminale de cette protéine, ou  
10 situé dans sa partie extra-membranaire, est choisi permettant l'insertion en 3' du fragment multimérisant.

L'extrémité 3' du fragment multimérisant est liée soit à un site du vecteur, soit à un site situé au-delà dans le gène de la protéine d'intérêt. La partie  
15 du gène de la protéine d'intérêt située en 3' du fragment multimérisant n'est de toute façon plus traduite, puisque le fragment multimérisant comporte un codon stop.

Il est donc possible ainsi de modifier très facilement un vecteur d'expression contenant le gène d'une protéine donnée par la simple insertion du fragment, sans autre modification.

Les vecteurs pCDM8, ST4, pMAMneo, ont été utilisés pour les différents  
20 exemples d'application du système multimérique selon l'invention.

L'homme du métier saura toujours trouver les vecteurs existants aujourd'hui ou qui risquent d'être mis au point, susceptibles de présenter la meilleure efficacité pour transduire la protéine de fusion dans les cellules est une affaire exprimée.

25

#### **Exemple d'application N° 1 :**

##### Prévention de l'alloimmunisation antiRh(D).

Dans le cadre d'une prévention de l'alloimmunisation anti Rh(D), des molécules hétéro-multimériques associant des fonctions érythrocytaires et  
30 CR1 sont produites. Elles permettront une liaison aisée de CR1 à des érythrocytes assurant des densités de CR1 parfaitement maîtrisables.

La molécule d'anticorps utilisée pour produire le scFv anti Rh(D) a été produite et séquencée dans le laboratoire de Philippe ROUGER à l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS) (9).

5 Construction des vecteurs comportant la séquence codant pour le scFv anti Rh(D) et la partie terminale de la chaîne α de la C4BP.

Dans un premier temps, un site épitopique d'un anticorps anti-Rhésus a été réduit en une structure de type scFv (pour single chaîne Fv) pour une expression dans E.Coli par transfection par un vecteur phagique.

10 Les constructions de type scFv sont des fragments d'anticorps représentant la partie variable de l'anticorps et ne contenant qu'une seule chaîne. Cette technique a été décrite par G. WINTER (10). La séquence codante pour ce scFv a ensuite été transférée dans un vecteur d'expression après addition du système multimérisant.

15 Nous avons décrit plus haut la construction des vecteurs d'expressions porteurs de la séquence codant pour le scFv de l'anticorps anti Rh(D), et qui sont représentés sur les figures 6 et 7.

La partie C terminale de la C4BP a été amplifiée par les amores 5'-GCGGCCGCAGAGACCCCCGAAGGCTGTG-3' contenant un site de restriction *Not I* et 5'-CCACTTGGATAAAGAACTATAA-3' contenant un 20 site de restriction *Xho I*.

Ce fragment a été inséré au site *Not I* en 3' du gène scFv anti Rh(D). Cette séquence a ensuite été insérée dans le plasmide pCDM8 et insérée aux sites *Hind III* et *Xho I* de pKC3b. Cette construction est représentée dans la figure 7.

25 La figure 5 représente une autre construction du scFv du anti Rh(D) C4BP dans le plasmide pKC 3B.

Les plasmides sont ensuite utilisés pour transduire des cellules animales et notamment des cellules CHO DHFR<sup>+</sup>.

30 Les cellules CHO-DHFR<sup>+</sup> (American Type Culture Collection, Rockville, USA) ont été transfectées selon la technique au phosphate de calcium (Calcium phosphate transfection kit, 5 prime 3 prime Inc., Boulder, U.S.A).

Les cellules sont cultivées en milieu HAM déficient en Hypoxanthine et Thymidine (Biochrom, Vindelle, France) avec 10 % de sérum de veau dialisé (SVF GIBCO BRL, Paisley, Ecosse) et 1% de glutamine (Sigma, St Louis, USA).

5 La fonctionnalité des protéines multimériques reconstituées, soit C4 BP-scFv, soit C4 BP-Rh(D)/CR1 a été étudiée.

La production fonctionnelle de scFv multimérique a été réalisée, telle que démontrée (i) par un marquage biosynthétique et une immunoprecipitation suivis d'analyse en PAGE SDS, (ii) par la détection en cytométrie de flux 10 de multi scFv anti Rh(D) fixés sur des érythrocytes, (iii) par le caractère agglutinant en faible force ionique sur des globules papaïnés de chimères multi scFv anti Rh(D), (iv) par analyse d'interactions moléculaires au moyen d'un appareil de détection d'ondes évanescentes (IASys FISONS) vérifiant la fixation sur des érythrocytes de la chimère multimérique anti 15 scFv anti Rh(D).

Par la suite, la faisabilité d'hétéromultimères associant différentes fonctions a été établie par la réalisation d'une chimère anti R(h)ésus D/CR1. Son caractère fonctionnel a été démontré en cytométrie de flux.

Les résultats obtenus en cytométrie de flux sont représentés sur la figure 20 10. Il est clair sur cette figure que si l'on compare les pistes 3 et 5 dans lesquelles respectivement les globules rouges sont Rh+ ou Rh-, on observe que seules les globules rouges possédant l'antigène de surface sont agglutinées. Ce que cette figure permet également de voir, c'est que ce n'est pas l'effet de la papaïne qui permet cette agglutination puisque les 25 globules rouges Rh+ papaïnées ne sont pas agglutinées par le CR1.

Il a été en effet possible de fixer une densité supraphysiologique de molécules CR1 sur des érythrocytes préalablement papaïnés et donc déplétés en CR1, par la fixation sur les molécules rhésus D d'une chimère mixte multimérique anti Rh(D) /CR1.

**Exemple d'application N° 2 : Destruction extracellulaire du VIH**

Si la réponse immune humorale est impuissante à éradiquer le virus VIH, elle est cependant efficace contre de nombreux agents infectieux contre lesquels des anticorps neutralisant sont régulièrement produits par les sujets vaccinés.

Des anticorps naturels peuvent conférer une protection contre de nombreux agents infectieux bactériens ou viraux, infectant d'autres espèces.

Certains motifs antigéniques ont été caractérisés comme cibles de ce type d'anticorps pour leur rôle dans le rejet suraigu vasculaire de transplantation xénogéniques.

Le rôle potentiellement défavorable de la réponse immune humorale et de l'activation du complément vis-à-vis de l'infection par virus VIH a été démontré.

Dans certaines circonstances, l'opsonisation des virions peut conduire à faciliter l'ingestion macrophagique ou la liaison lymphocytaire des virions par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires pour le complément ou le fragment Fc des IgG. En revanche le virus VIH, en tant que virus enveloppé, est extrêmement sensible à l'action lytique du complément

lorsque l'activation de ce dernier est suffisante pour initier sa voie finale lytique ainsi que la fixation de son complexe d'attaque membranaire. Les rétrovirus xénogènes sont détruits extrêmement efficacement par le sérum humain normal du fait de l'existence d'anticorps naturels, par l'intermédiaire d'une activation du complément. Ce phénomène avait même fait conclure dans les années 1970 à l'immunité naturelle de l'espèce humaine vis-à-vis des rétrovirus.

Le but recherché est le détournement d'une réponse immune humorale lytique vers les virions VIH, l'attachement aux virions étant réalisé par la composante CD4 d'une protéine recombinante hétéromultimérique. Pour cela, les inventeurs ont pris en compte le fait que la très grande variabilité

du virus VIH est cependant limitée par le maintien constant, essentiel pour le virus, d'une capacité de liaison à CD4, pour sa pénétration cellulaire. Réciproquement, la molécule CD4 est capable de se lier à l'ensemble des virions VIH, au contraire de nombreux anticorps neutralisants au spectre 5 d'efficacité restreint à un petit nombre de sous-type. La molécule de CD4 soluble inhibe l'infection cellulaire par le VIH. Cependant, les concentrations nécessaires à son action, particulièrement pour la neutralisation d'isolats sauvages, rendent impraticable son emploi clinique. Différentes tentatives ont été faites pour améliorer sa demi-vie, son avidité 10 et/ou apporter une fonction Fc gamma effectrice de liaison cellulaire ou d'activation de complément par des constructions de type : CD4/IgG bi ou tétravalent.

Les inventeurs ont développé une molécule CD4 multivalente heptamérique à l'aide d'un système multimérisant C4BP, dont l'efficacité 15 biologique in vitro a été démontrée par l'inhibition de l'infection de cellules sensibles par le VIH à des concentrations inhibitrices usuelles de CD4 soluble monomérique.

Dans le présent exemple, les inventeurs ont, plutôt que d'inhiber la pénétration cellulaire du virus, cherché à obtenir sa destruction 20 extracellulaire à l'aide de molécules solubles capables, d'une part de se lier sur le virion, et d'autre part d'apporter une fonction effectrice antigène, élicitant la destruction du virus par une réponse anticorps dépendante du complément préexistante chez l'individu. Cette réponse est dirigée contre 25 un antigène sans rapport avec le VIH, mais vis-à-vis duquel une efficacité neutralisante et lytique du système immunitaire a été néanmoins testée.

En d'autres termes, le virus VIH ayant la capacité de se « déguiser », de se « cacher » ou d'« agiter des leurres », les inventeurs ont cherché à l'orner de cibles que le système immunitaire de l'individu sait identifier et traiter efficacement.

Pour ce faire, deux constructions plasmidiques ont été réalisées portant respectivement le CD4 ou le fragment du CD4 porteur de la fraction «ligand » et un antigène.

5    a) Construction du vecteur ST4 CD4-C4BP

Les 183 derniers acides nucléiques de la séquence codant pour la C4BP ont été amplifiés par PCR sur de l'ADN génomique, en utilisant les amorces : 5'-GAGACCCCCGAAGGCTGTGTGA-3' et 5'ATTCTAGAGAGTTATAGTTCTTATCCAAAGTGGA-3', cette dernière 10 amorce contenant un codon stop et un site de restriction pour Xba I. Ce fragment de PCR a été lié en 5' à une séquence oligonucléotidique synthétique double-brins:  
5'CCGGGACAGGTCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCACAG-  
3'. Ce fragment codant pour l'extrémité C-terminale de la partie 15 extramembranaire de CD4 et ayant un site Ava I en 5'.

Cette séquence a été insérée aux sites Ava I et Xba I dans le plasmide sT4 CD4 contenant la construction codant pour le CD4 soluble et cette construction est représentée sur la figure 1.

20    b) Construction des molécules de fusion C4BP- antigènes

Dans un premier temps il s'agit de rechercher quels paramètres conduisent la réponse anticorps gp 120 des sujets infectés à une activation du complément jusqu'à la boucle d'amplification du C3, aboutissant à une opsonisation plutôt favorable à l'individu, sans s'accompagner pour autant 25 de l'activation de la voie finale commune qui aboutirait à la lyse du virion. Le rôle de molécules de surface d'inhibition de l'activation du complément que le virion a emporté de la surface cellulaire, est démontré. Le relargage de particules d'enveloppe lors de la fixation d'anticorps (shedding) est également défavorable à l'activation terminale du complément. L'activation 30 de la voie finale commune du complément nécessite une densité critique d'activation du C3 pour initier la conversion de C5. Celle-ci n'est pas

réalisée par la fixation d'IgG sur des épitopes de la gp 120 trop éloignés les uns des autres.

L'apport d'une « grappe » d'antigènes grâce aux constructions de l'invention pour chaque site de liaison sur le virion permet donc de 5 déclencher une activation locale suffisante du complément.

Différentes catégories d'antigènes ont été considérées : des antigènes vaccinaux, des antigènes bactériens contre lesquels l'espèce humaine est universellement immunisée, des antigènes xénogéniques cibles d'anticorps naturels.

10 - des antigènes vaccinaux existant sous forme de gènes clonés codant pour une protéine exprimable en cellules eucaryotes (antigène Hbs, anatoxine téstanique...),

15 - des antigènes bactériens vis-à-vis desquels il existe une forte immunité dans l'espèce humaine (Escherichia-Coli, Klebsielle, flagelline de Shigelle, ou antigène de Salmonelle),

20 - des molécules possédant les séquences protéiques acceptrices de glycosylations xénogéniques peuvent également être envisagées après qu'elles aient été produites par des cellules animales possédant de fortes activités glycosyl transférase qui leur grefferont les cibles glucidiques d'anticorps naturels connus comme réagissant fortement en 25 xénotransplantation (par exemple : groupement alpha-galactosyl, obstacle aux transplantations xénogéniques porc-homme).

Ces mini-anticorps seront utilisés comme agents de liaison érythrocytaire d'hétérochimères dont ils ne représenteront qu'une valence de type C4BP 25 β associée à une molécule antigénique multimérique de type C4BP α heptamérique. Le système antigénique le plus efficace sera ainsi sélectionné dans un test de criblage aisément quantifiable. Il sera alors transféré dans une chimère recombinante CD4/cible antigénique dont différents ratios CD4/antigène (1CD4/7antigènes ou nCD4/M antigènes) 30 seront testés dans un modèle d'inhibition d'infection virale in vitro.

Ces mini-anticorps seront utilisés comme agents de liaison érythrocytaire d'hétérochimères dont ils ne représenteront qu'une valence de type C4BP bêta associée à une molécule antigénique multimérique de type C4BP alpha heptamérique. Le système antigénique le plus efficace sera ainsi 5 sélectionné dans un test de criblage aisément quantifiable. Il sera alors transféré dans une chimère recombinante CD4/cible antigénique dont différents ratios CD4/antigène (1CD4/7antigènes ou nCD4/M antigènes) seront testés dans un modèle d'inhibition d'infection virale in vitro.

Les antigènes cibles les plus intéressants ont été insérés dans des 10 constructions hétéromultimériques comportant le CD4 et testés pour leur capacité à permettre la destruction de virions VIH en présence de sérum humain et de complément, le pouvoir infectieux résiduel étant évalué dans un test d'inhibition d'infection cellulaire in vitro.

Matériels et méthodes :

15 Outre les constructions citées plus haut, les techniques de transfection et de culture cellulaires utilisées ont été les suivantes :

Transfection :

Les cellules CH0-DHFR<sup>-</sup> (American Type Culture Collection, Rockville, USA) ont été transfectées selon la technique au phosphate de calcium 20 (Calcium phosphate transfection kit, 5 prime 3 prime Inc., Boulder, U.S.A).

Culture Cellulaire:

Les cellules sont cultivées en milieu HAM déficient en Hypoxanthine et Thymidine (Biochrom, Vindelle, France) avec 10 % de sérum de veau dialysé (SVF GIBCO BRL, Paisley, Ecosse) et 1% de glutamine (Sigma, St Louis, USA).

Les cellules transfectées par pMAMNeo sont sélectionnées par leur capacité de résistance à la néomycine (G418, 0.7 microg/ml) (Sigma).

La production de mCR1 dans les cellules transfectées par le pMAMneo CR1-C4BP est induite par la dexamethasone (0.8 microg/ml).

30 Les inventeurs ont utilisés pour leurs expériences un appareil de cultures cellulaires en continu, en fibres creuses pour la production de protéines

recombinantes à l'échelle de quelques milligrammes ou quelques dizaines de milligrammes de protéines recombinantes. La plupart des expériences pourront être menées à partir de surnageants de culture bruts ou concentrés. Des préparations purifiées à petite échelle ont également été  
5 préparées.

Les synthèses d'oligonucléotides utilisées pour les constructions vectorielles ont été effectuées pour adapter le fragment C4BP C terminal sur chaque construction. Egalement les séquences nucléotidiques ont été déterminées sur séquenceur automatique à fluorescence pour le contrôle  
10 des constructions.

### Commentaires

Les protéines multimériques de l'invention, leur utilisation dans la fabrication d'un médicament à visée prophylactique ou thérapeutique, ou  
15 leur utilisation comme outil de diagnostic ou de recherche sont très puissantes.

Leur utilisation peut être un outil efficace pour l'analyse de mécanismes physiologiques dans la réponse immune, de même que pour comprendre la physiopathologie de certaines affections dysimmunitaires.  
20 De telles molécules doivent permettre une immuno-intervention plus sophistiquée ouvrant la possibilité de mieux étudier *in vitro* de nombreux mécanismes physiopathologiques. Dans certains cas, elle ouvrira la voie à une immuno-manipulation *in vivo* dans un but thérapeutique. Il s'agit donc à la fois d'outils de recherche clinique physiopathologique, d'une  
25 recherche expérimentale *in vitro* et d'outils thérapeutiques *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- 5      1. Matsuguchi T, Okamura S, Aso T, Niho Y. Molecular cloning of the cDNA coding for PRP : identity of PRP as C4BP. Biochem Biophys Res Commun 1989 ; 1 : 139-44.
- 10     2. Scharfstein J, Ferreira A, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. J exp Med 1978 ; 148 : 207-22.
- 15     3. Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. J. Exp Med 1978; 148 : 1044-51.
- 20     4. Chung LP, Bentley DR, Reid KBM. Molecular cloning and charaterization of the cDNA coding for C4b-binding protein, a regulatory protein of the classical pathway of the human complement system. Biochemistry 1985 : 230 : 133-41.
- 25     5. Monte G. Thrombosis and Haemostasis - 69 (1) 86 (1993).
- 30     6. Hillarp. A (1990) PNAS vol 87 pp 1183-1187.
7. Hillarp. A (1991) Scand. J. Chin. Lab. Invest. Fi, Suppl 204 : 57-69.
8. Fanger M.W. Immunomethods 1994 - P. 72 à 81 « Production and use of anti FcR bi-specific antibodies ».
9. Goossens D., Champomier F, Rouger Ph. and Salmon Ch. Human monoclonal antibodies against blood group antigens : preparation of a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of antibody of different isotypes and specifites. J. of immunological methods., 101, 193,1987.
10. Winter G. Nature 1990 -348- P. 552-554. M. Cafferty J., Griffiths A, Winter G., Chiswell. « Phage antibodies filamentous phase displaying antibody variable domains ».

REVENDICATIONS

1. Protéine multimérique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

5 a) une molécule de fusion A, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  de la C4BP compris entre les acides aminés 124 et 549 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à ladite chaîne  $\alpha$ ,

10 b) une molécule de fusion B, de nature polypeptidique constituée d'un fragment C-terminal de la chaîne  $\beta$  de la C4BP compris entre les acides aminés 120 et 235 et d'un fragment polypeptidique hétérologue à la chaîne  $\beta$ ,

les molécules en a) et b) étant associées dans leur partie C-terminale pour

15 former ladite protéine multimérique.

2. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fragment C-terminal de la chaîne  $\alpha$  est compris entre les acides aminés 493 et 549 et, en ce que le fragment C-terminal de

20 la chaîne  $\beta$  est compris entre les acides aminés 176 et 235.

3. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le rapport en nombre de monomère  $\alpha$  /  $\beta$  varie entre 7/1 et 5/3, et est de préférence de 7/1.

25 4. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que les fragments hétérologues en A et en B sont issus de ligands spécifiques du système immunitaire, notamment issus de protéines lymphocytaires de surface du type CD, d'anticorps ou de

30 fragments d'anticorps, d'antigènes ou de fragments d'antigènes.

5. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que les fragments issus de protéines lymphocytaires sont le CD4, le CD8, le CD16, le CD35 (ou CR1).

5 6. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que les anticorps ou fragments d'anticorps ont une spécificité anti Rh(D).

10 7. Protéine multimérique recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que les antigènes sont des antigènes vaccinants.

8. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le fragment hétérologue en A est une enzyme thérapeutique.

15

9. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

20 - en A le CD4 ou un dérivé du CD4 et;  
- en B le scFv d'un anticorps, notamment un anticorps neutralisant ou, un anti Rh (D).

25 10. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

- en A un antigène, notamment un antigène vaccinant, ou une enzyme thérapeutique ou un CD35 (ou CR1) ou un anticorps, ou tout fragment de ceux-ci possédant la propriété de ligand de la molécule entière,  
- en B un anticorps ou un fragment de celui-ci ayant conservé son épitope.

11. Protéine multimérique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les fragments polypeptidiques de fusion contiennent :

- en A un immogène vaccinant et
- 5 - en B un CD4 ou une molécule dérivée pourvu qu'elle conserve la propriété du ligand de la molécule entière.

12. Cellules procaryotes ou eucaryotes caractérisées en ce qu'elles ont été transduites par un ou plusieurs plasmides contenant une séquence 10 d'acide nucléique hétérologue codant pour au moins une molécule polypeptidique de fusion A et une molécule polypeptidique de fusion B.

13. Cellules selon la revendication 12 caractérisées en ce que les cellules ont été soit,

- 15 - co-transduites par deux plasmides distincts, soit
- transduites par un premier plasmide codant pour un premier polypeptide puis sur-transduites par le deuxième plasmide codant pour le deuxième polypeptide, soit ,
- résultent de la fusion de deux cellules dont l'une a été transduite par un 20 plasmide codant pour le premier polypeptide et l'autre a été transduite par un plasmide codant pour le deuxième polypeptide.

14. Cellules selon l'une des revendications 12 ou 13 caractérisées en ce que le premier plasmide est celui déposé le 12 juillet 1995 à la 25 C.N.C.M. sous le N° I-1610 et le deuxième plasmide est celui déposé à la C.N.C.M; le 12 juillet 1995 sous le N° I-1611.

15. Procédé de préparation d'une protéine multimérique définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il 30 comprend au moins les étapes suivantes :

- la transduction de lignées cellulaires cibles par au moins un plasmide contenant chacune une séquence hétérologue codant respectivement pour une chaîne A ou B selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,
- l'expression et isolement des chaînes hétérologues A et B,
- 5 - la mise en milieu oxydant desdits polypeptides dans des proportions déterminées,
- l'isolement des multimères.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que les lignées  
10 transduites ont été soit :

- co-transduites par deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou
- sur-transduites par deux plasmides, deux plasmides porteurs de séquences d'ADN codant respectivement pour les polypeptides A et B, ou
- 15 - résultent de la fusion de cellules ayant respectivement été transduites par un plasmide porteur d'une séquence d'ADN codant pour le polypeptide A et par un plasmide porteur d'une séquence d'ADN codant pour le polypeptide B.

20 17 Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament destiné à la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle.

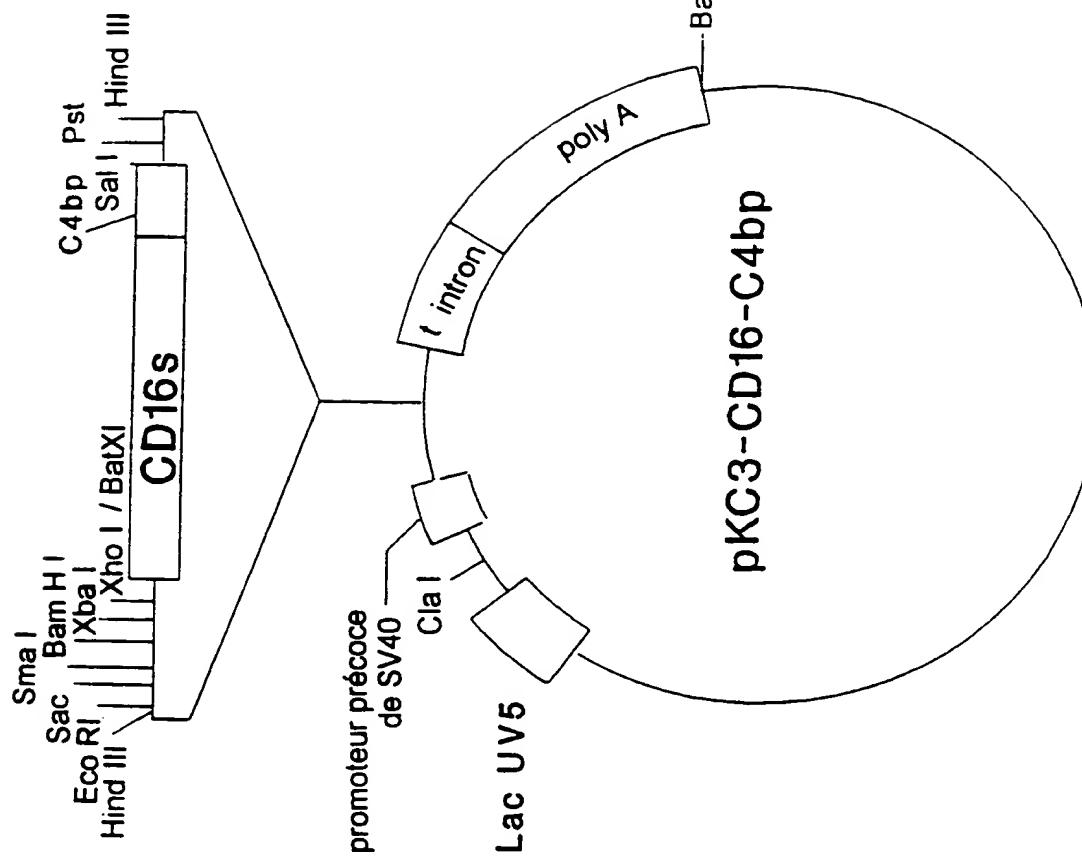
25 18. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament destiné à la thérapeutique ou à la prophylaxie des infections virales, bactériennes ou parasitaires.

30 19. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 à la fabrication d'un médicament

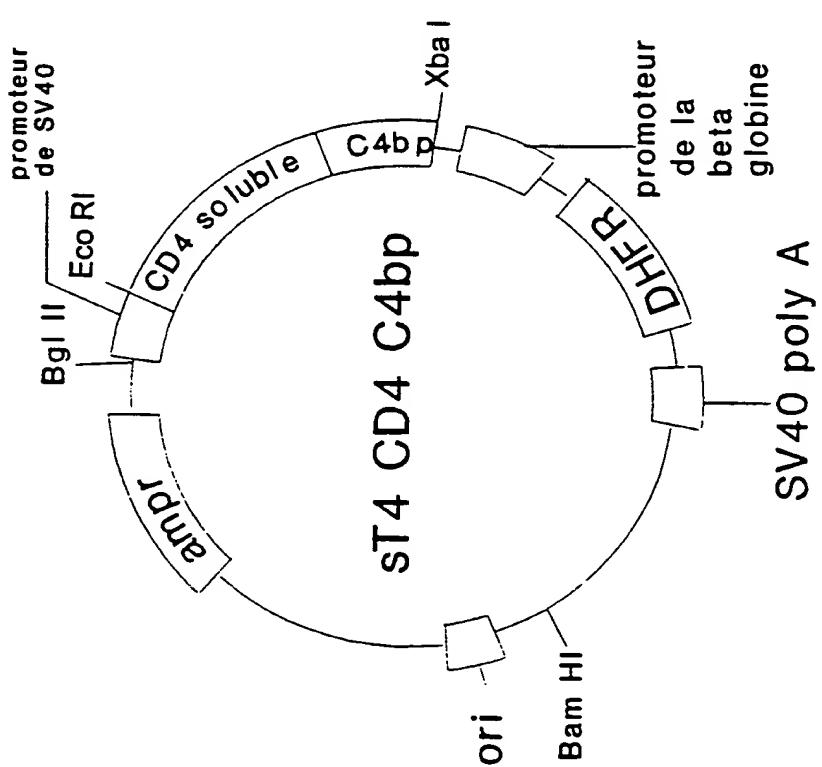
destiné à la thérapeutique des maladies auto-immunes et notamment le lupus erythémateux disséminé.

20. Utilisation d'une protéine multimérique recombinante selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 11 dans un test de diagnostic nécessitant l'intervention d'au moins deux ligands différents.

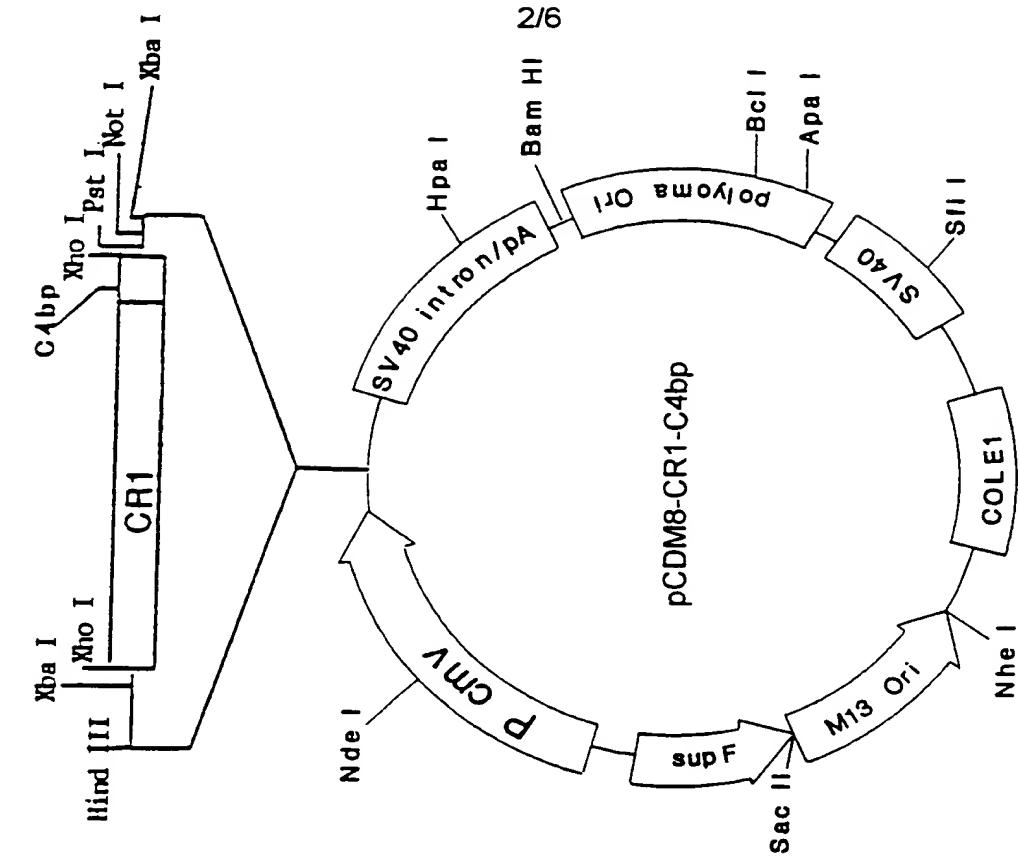
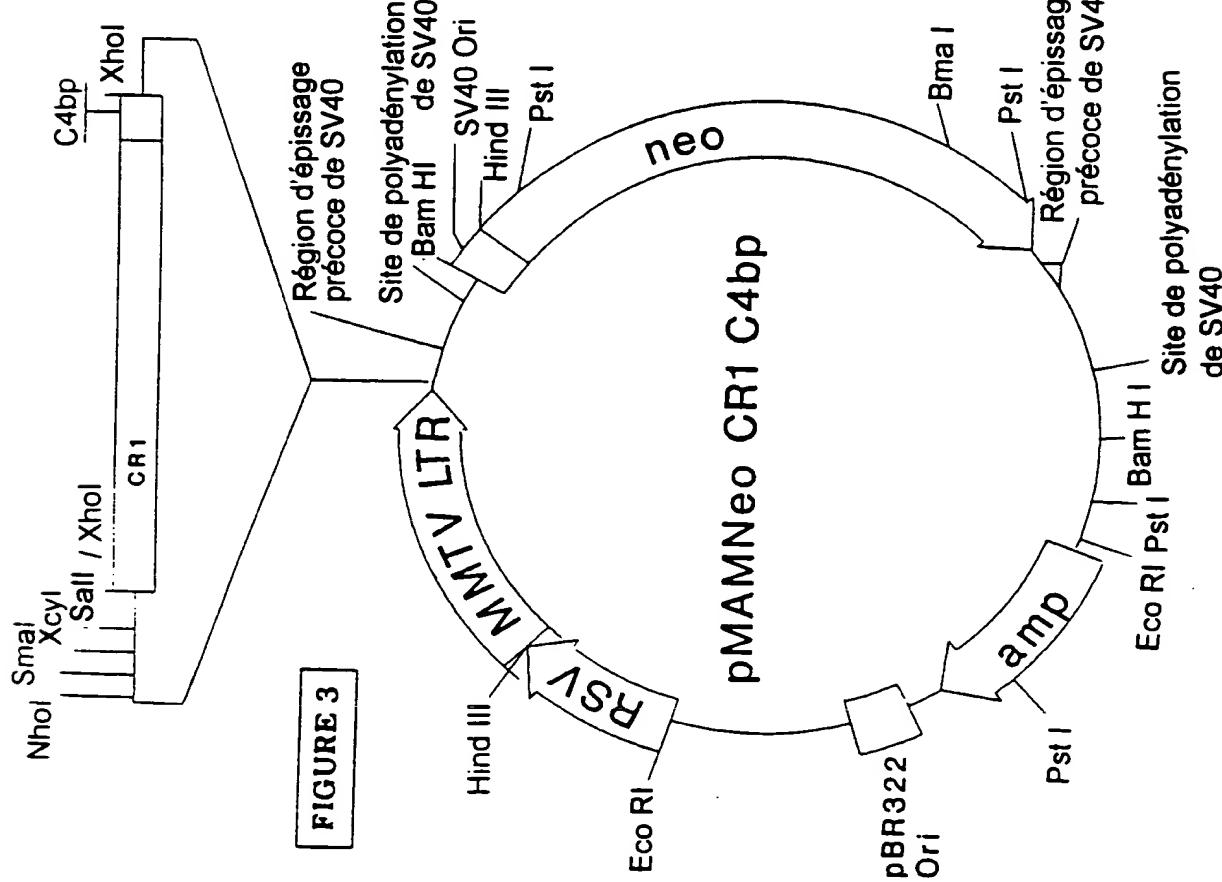
21. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend en tant que principe actif une protéine multimérique selon l'une  
10 quelconque des revendications 1 à 11, ladite composition pharmaceutique permettant une immuno-thérapie ou une immuno-prévention de pathologies liées notamment aux infections virales, bactériennes, aux maladies auto-immunes ou allo-immune.



**FIGURE 2**



**FIGURE 1**



3/6

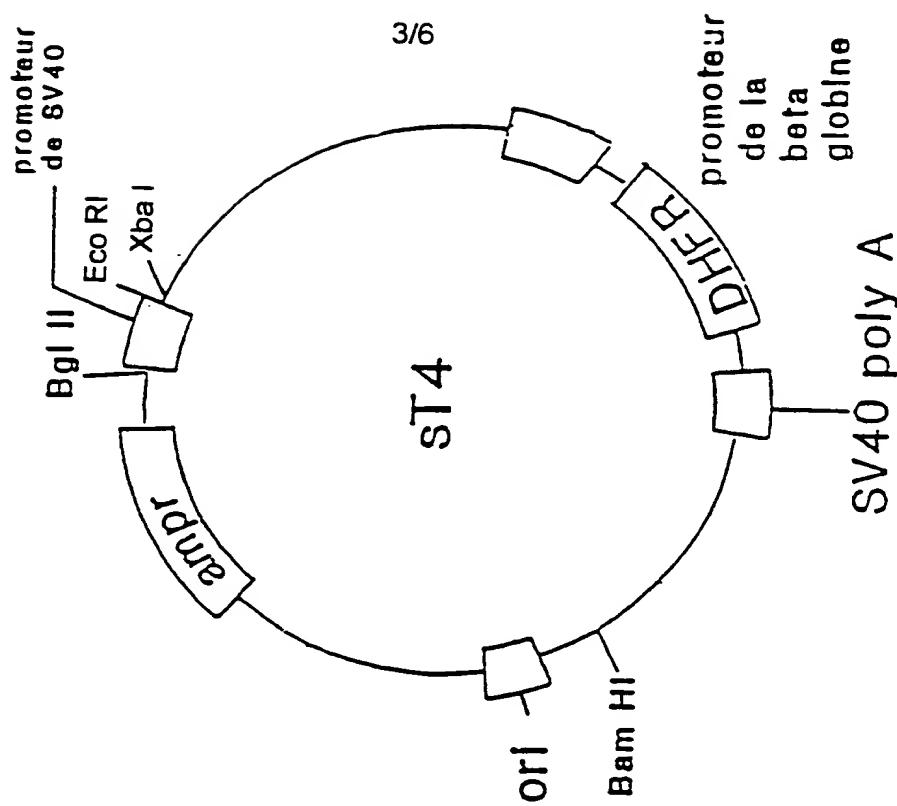


FIGURE 6

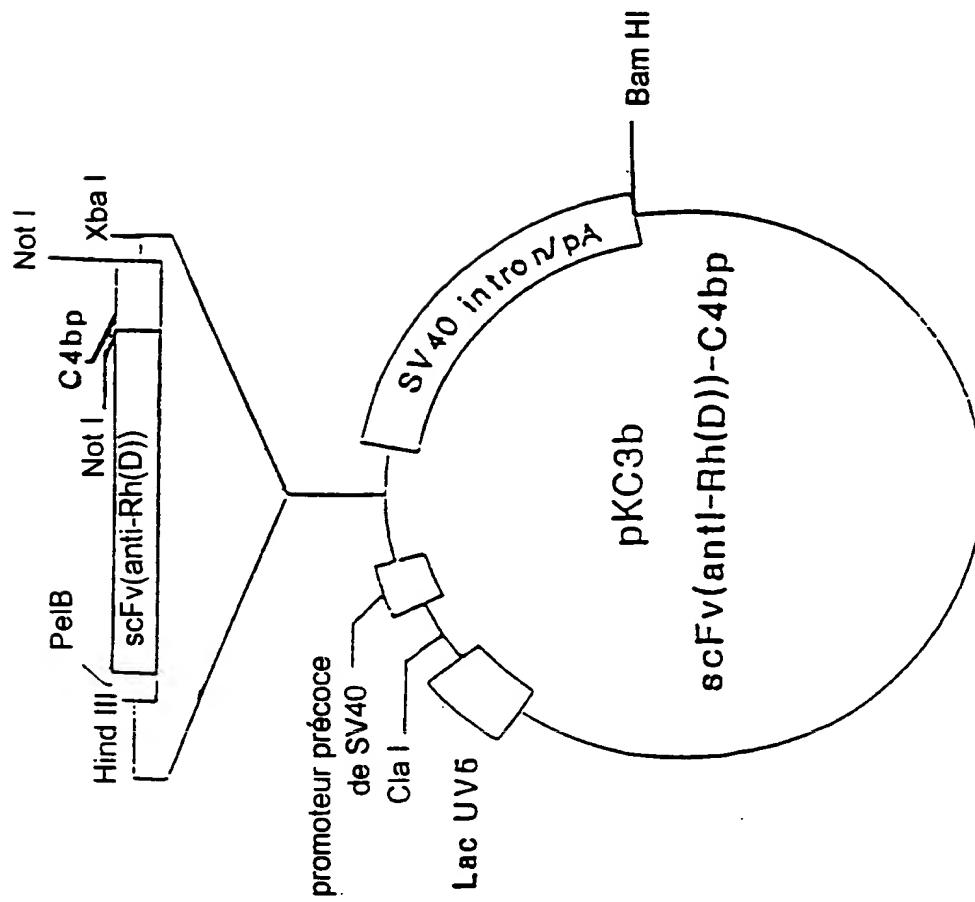


FIGURE 5

4/6

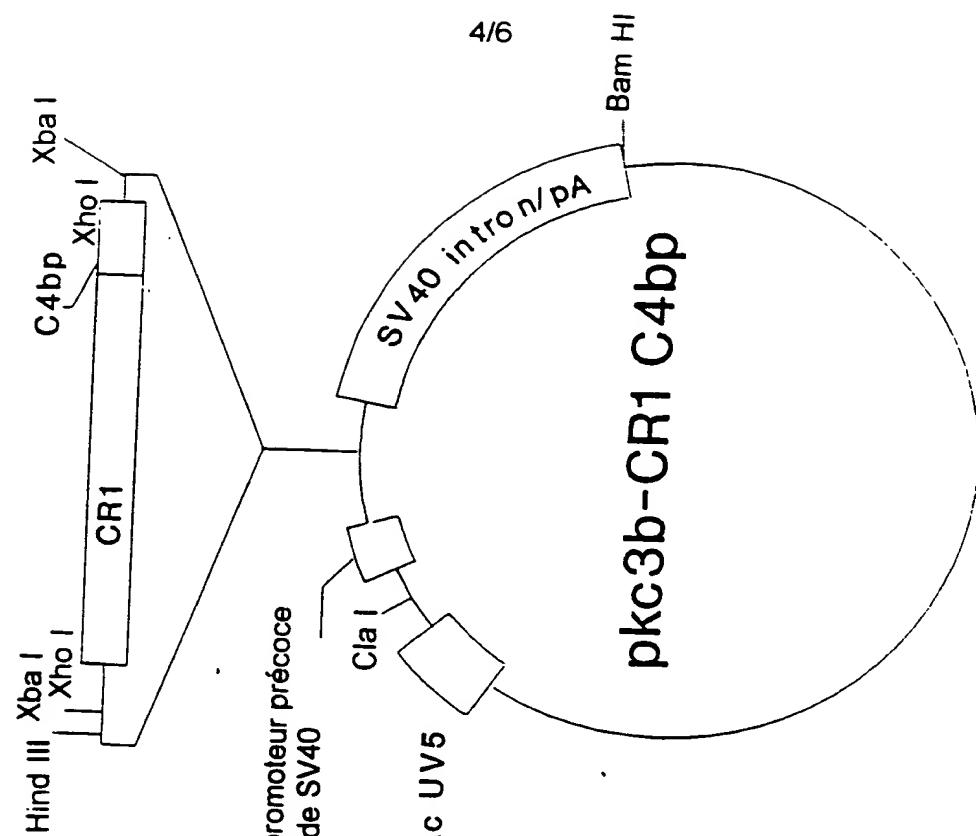


FIGURE 8

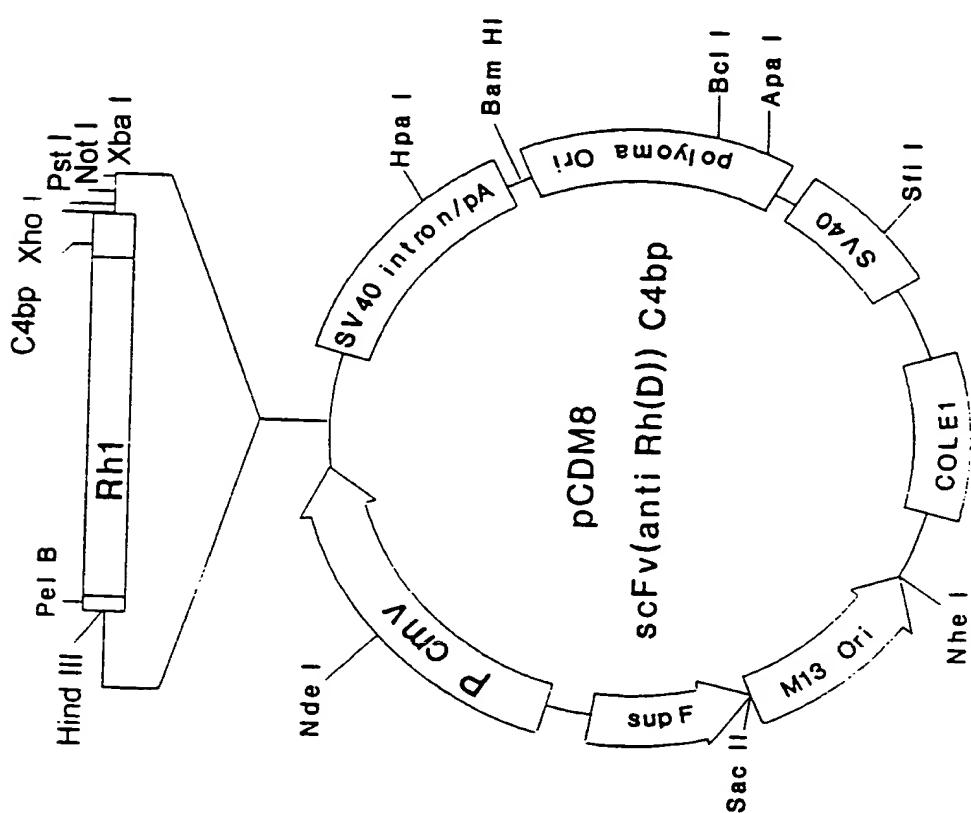
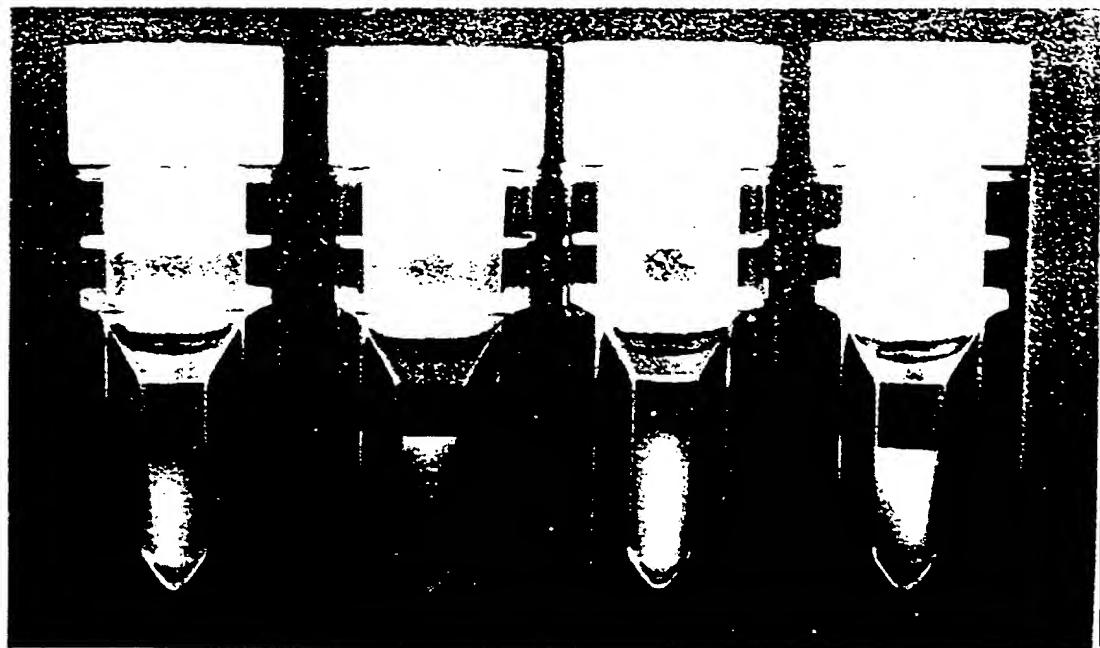


FIGURE 7



A

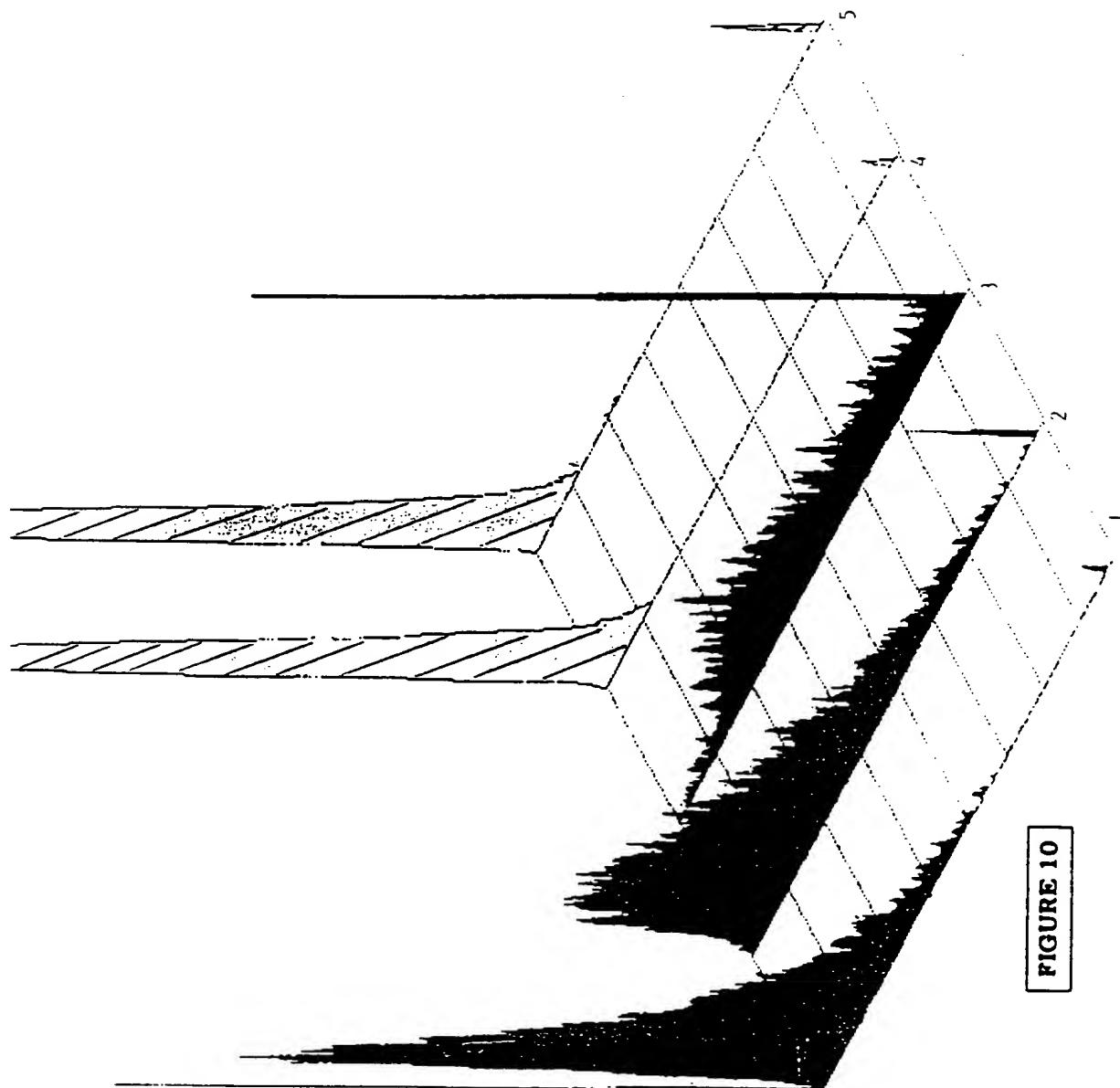
B

C

D

**FIGURE 9**

6/6

**FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)**

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

De la Internationale No

PCT/FR 96/01132

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
 CIB 6 C12N15/62 C07K14/47 A61K38/17 C12N5/10 C12N1/21

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisés

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J BIOL CHEM, FEB 15 1993, 268 (5) P3033-6, UNITED STATES, XP002013808 ANDERSSON A ET AL: "High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in Escherichia coli." voir le document en entier --- A WO,A,91 11461 (BIOGEN INC) 8 Août 1991 cité dans la demande voir le document en entier -----	1,12,15, 17,21  1,12,15, 17,21

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 96/01132

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9111461	08-08-91	AU-A- 7328891 EP-A- 0465633 JP-T- 4506460	21-08-91 15-01-92 12-11-92

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 96/01132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C12N15/62	C07K14/47	A61K38/17	C12N5/10	C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J BIOL CHEM, FEB 15 1993, 268 (5) P3033-6, UNITED STATES, XP002013808 ANDERSSON A ET AL: "High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in Escherichia coli." see the whole document ---	1,12,15, 17,21
A	WO,A,91 11461 (BIOGEN INC) 8 August 1991 cited in the application see the whole document -----	1,12,15, 17,21

Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

20 September 1996

Date of mailing of the international search report

27.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members:

International Application No.

PCT/FR 96/01132

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9111461	08-08-91	AU-A-	7328891	21-08-91
		EP-A-	0465633	15-01-92
		JP-T-	4506460	12-11-92

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No  
PCT/FR 96/01132

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/62 C07K14/47 A61K38/17 C12N5/10 C12N1/21

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J BIOL CHEM, FEB 15 1993, 268 (5) P3033-6, UNITED STATES, XP002013808 ANDERSSON A ET AL: "High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in Escherichia coli." voir le document en entier ---	1,12,15, 17,21
A	WO,A,91 11461 (BIOGEN INC) 8 Août 1991 cité dans la demande voir le document en entier -----	1,12,15, 17,21

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  
20 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets,

International No  
PCT/FR 96/01132

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9111461	08-08-91	AU-A- 7328891 EP-A- 0465633 JP-T- 4506460	21-08-91 15-01-92 12-11-92

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

1997

PCT

WIPO

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>B2892A - FL</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> Voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° <b>PCT / FR 96 / 01132</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>18/07/1996</b>	Date de priorité (jour/mois/année) <b>21/07/1995</b>
Classification internationale des brevets (CIB) ou classification nationale et CIB <b>C12N15/62</b>		
Déposant <b>UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE .... et al.</b>		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend **7** feilles, y comprise la présente feuille de couverture.

Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent \_\_\_\_\_ feilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:

I  Base du rapport

II  Priorité

III  Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

IV  Absence d'unité de l'invention

V  Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

VI  Certains documents cités

VII  Irrégularités dans la demande internationale

VIII  Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international

**14/02/1997**

Date d'achèvement du présent rapport

**13.06.97**

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Office Européen des Brevets  
D-80298 Munich  
Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d  
Fax: (+ 49-89) 2399-4465

Fonctionnaire autorisé

N° de Téléphone

**A. Ury**

## I. Base du rapport

1. Le présent rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (Les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.):

[x] de la demande internationale telle qu'initialement déposée.

[ ] de la description, pages \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
pages \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

[ ] des revendications, nos. \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
nos. \_\_\_\_\_, telles que modifiées en vertu de  
l'article 19,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

[ ] des dessins, feuilles/fig \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

2. Les modifications ont entraîné l'annulation

[ ] de la description, pages \_\_\_\_\_.

---

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n'

PCT/FR96/01132

[ ] des revendications, nos. \_\_\_\_\_.

[ ] des dessins, feuilles/fig. \_\_\_\_\_.

3. [ ] Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé (règle 70.2.c)).

4. Observations complémentaires, le cas échéant:

V. Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

---

## 1. DECLARATION

Nouveauté Revendications 1-21 \_\_\_\_\_ OUI  
Revendications \_\_\_\_\_ NON

Activité inventive Revendications 1-21 \_\_\_\_\_ OUI  
Revendications \_\_\_\_\_ NON

Possibilité d'application industrielle Revendications 1-19 et 21 \_\_\_\_\_ OUI  
Revendications \_\_\_\_\_ NON

---

## 2. CITATIONS ET EXPLICATIONS

Les documents (D) suivants ont été pris en compte pour l'établissement du rapport d'examen préliminaire:

D1: WO 91/11461

D2: J.B.C., 268(5), 1993, pp.3033-36.

I) Le document D1 (considéré comme état de la technique le plus proche parmi les documents cités dans le RRI) décrit des protéines multimériques recombinantes du type C4BP uniquement constituées de monomères alpha dans lesquels les parties N-terminales ont été substituées par des polypeptides hétérologues, notamment par des fragments de la protéine CD4.

Bien que D1 (page 4, lignes 12-21) mentionne l'existence d'une autre sous unité de 45kD (correspondant à la chaîne beta) associée à C4BP, les constructions décrites dans ce document ne mettent en oeuvre que la chaîne alpha.

D1 considéré seul ou combiné avec D2 ne divulgue ni ne suggère l'objet de la présente demande, à savoir des

---

protéines multimériques recombinantes du type C4BP constituées non seulement de monomères alpha dans lesquels les parties N-terminales ont été substituées par des polypeptides hétérologues mais également de monomères beta dans lesquels les parties N-terminales ont été substituées par des polypeptides hétérologues.

Ainsi, l'objet de la présente demande est conforme aux dispositions de l'Article 33.2 et 3 PCT.

II) Il n'existe pas de critère unique dans le PCT pour déterminer si la revendication 20 (qui n'exclue pas une utilisation in vivo) est susceptible d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont la revendication est formulée. Ainsi, l'Office Européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, seront acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL****VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description:

- 1) La revendication 12 ne remplit pas les conditions découlant des dispositions combinées de l'Article 6 PCT et de la Règle 6(3)(a) PCT, selon lesquelles une revendication doit définir l'objet pour lequel la protection est demandée en terme de caractéristiques techniques de l'invention. En effet, les polypeptides de fusion A et B ne sont pas définis.
- 2) Dans les revendications 1 et 2, l'expression "fragment ... (est) compris entre les acides aminés ... et ..." est vague et équivoque car elle n'exclue pas des fragments très courts (1 ou 2 acides aminés) n'étant pas du tout caractéristiques des chaînes alpha ou beta. Ceci introduit une ambiguïté quant à l'objet réel des revendications. La condition de clarté énoncée à l'Article 6 PCT n'est donc pas remplie.
- 3) Dans le cadre de la présente demande, un monomère n'est pas constitué par alpha ou beta mais par une molécule de fusion A ou B (voir revendication 3).
- 4) Dans les revendications 9 et 10, "les fragments polypeptidiques de fusion" ne correspondent à aucun élément défini dans les revendications 1-3.
- 5) Il semble que le terme "transduit" (revendications 12-13 et 15-16) soit impropre dans la mesure où il s'applique aux virus et non aux plasmides.
- 6) La revendication 15 (page 27, lignes 1-3) n'est pas clairement formulée. La transduction telle que décrite dans ce passage ne permet pas "l'expression et

l'isolement des chaînes hétérologues A et B". A noter que le passage correspondant de la description (page 8, lignes 9-18) n'est pas compatible avec cette revendication 15.

7) Dans la revendication 16, l'obtention de lignées sur-transduites suppose deux étapes (voir page 8, lignes 23-25 de la description). Ceci ne ressort pas de la formulation utilisée.